



# **SUSCEPTIBILIDAD O RESISTENCIA DE LA GLÁNDULA MAMARIA AL DESARROLLO DEL CÁNCER.**

**INFLUENCIA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA EXPOSICIÓN PUBERAL Y/O EN  
EDAD ADULTA A DIETAS RICAS EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA Y DE MAÍZ.**

Memoria presentada por RAQUEL ESCRICH NAVARRO para optar al grado de Doctor en Biología.

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección de la Dra. RAQUEL MORAL CABRERA y el Dr. EDUARD ESCRICH ESCRICHE en el Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, estando adscrito al programa de Doctorado de Biología Celular.

Raquel Escrich Navarro

Raquel Moral Cabrera

Eduard Escrich Escriche

Bellaterra, juny 2013.



Este trabajo ha sido cofinanciado en parte mediante ayudas del Plan Nacional de I+D+I [2004-2007] AGL2006-0769/ALI, Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008-2012 (FPCO2008-165.396), Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino (AAO2008-165.471) y Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español 2009-2013 (OIP2009-165.646).

Los patrocinadores no han intervenido en el diseño del estudio, la obtención de datos, o el análisis e interpretación de los resultados de este trabajo.



*A les ratetes*



*Los que hemos escalado montañas hemos tenido presente siempre ante nosotros el hecho de la superioridad de la perseverancia y de la voluntad sobre la fuerza bruta. Sabemos que cada paso y cada altura han de ganarse con paciencia y laborioso trabajo, porque el deseo no sustituye al trabajo; conocemos los beneficios de la ayuda mutua; nos consta que se hallarán muchas dificultades y muchos obstáculos habrán de ser vencidos o volteados; pero, asimismo estamos ciertos de que donde hay voluntad, hay un camino; y volveremos a nuestras ocupaciones cotidianas más aptos para luchar en la batalla por la vida y superar los obstáculos que obstruyan nuestras rutas, reforzadas y animados por el recuerdo de pasadas labores y por la memoria de victorias ganadas en otros terrenos.*

*Edward Whymper*

*Coronar el cim d'una muntanya era un acte tangible, immutable, concret. Els perills inherents a l'alpinisme donaven a la meva activitat un rigor que lamentablement trobava a faltar a la resta de la meva vida. M'emocionava davant la mera possibilitat d'evadir-me de l'existència ordinària. A la muntanya també aprenies a viure en comunió. Fer-se alpinista era apuntar-se a una societat tancada, rabiosament Idealista, Incorrupta i del tot Desapercebuda del Món.*

*Jon Krakauer*

*Quan hom arriba al final d'un camí, reflexiona sobre totes les coses que li han anat passant, des de les bones a les dolentes, passant per les increïbles. N'hi ha hagut de tots colors però prefereixo quedar-me amb els bons moments viscuts i els seus instants de felicitat. Per això vull agrair profundament a totes les persones que han compartit amb mi aquest camí que encara que és personal, mai he notat la solitud... més aviat el contrari... així que només dir que em sento una persona molt afortunada.*

*Al Dr. Eduard Escrich Escriche, Professor del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, Director del Grup Multidisciplinari per a l'Estudi del Càncer de Mama i Director de l'Institut de Recerca Biomèdica CST-UAB, per la seva direcció. Moltes gràcies per la intensitat, proximitat i rigorositat amb les quals m'has format com a persona i investigadora. Gràcies per regalar-me una filosofia de vida, valorant el dia a dia, buscant constantment les emocions que ens fan vibrar com a persones. Però sobretot, moltes gràcies per totes les innumerables vivències, tant enriquidores com excitants, viscudes a la nostra estimada muntanya... començant per la Tour Ronde, passant pel Mont Blanc i acabant (o no) al Camp Base de l'Everest. I finalment, gràcies per haver-me donat "Palabras per a Julia" un 20 de març del 99.*

*A la Dra. Raquel Moral Cabrera, Professora del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la seva direcció. Moltes gràcies per la teva paciència, dedicació i esforç centrats en aquesta tesi de la que en el seu dia va ser la Raquel2 al Fox Chase. Mil gràcies per les paraules d'ànims i comprensió, i per arrancar-me un bri d'esperança en els moments que creia defallir, però sobretot moltes gràcies per ser com ets, amb l'alegria i optimisme que et caracteritzen es fa molt fàcil estar al teu costat, sobretot si hi ha filosofades amb dinosaures, Melatonina i Kisspeptina pel mig!!*

*A la Dra. Montserrat Solanas García, Professora del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, per ser una gran investigadora, amb rigor i constància de la qual he après molt. Guardo en el record molts bons moments compartits de laboratori, a l'estabulari i a congressos variis. Perquè els anys que fa que em coneixfa que sigui molt més que una companya.*

*Als meus companys de laboratori Irmgard, Laura G., Marina, Laura M, Miquel, Txell, Nadia, Cris, Marta i Xavi, i a les recent arribades Cristina i Isabel, pels bons moments viscuts tan dins como a fora del laboratori, y en especial a Elena, la eterna companyera de despacho y estabulario, i a Mila, per les hores davant el microscopi debatent sobre les tincions, macròfags i Mortadelos.*

*Als alumnes interns que participaren en la sèrie experimental: Paula Poveda, Melcior Carbonell, Francesca Rapino, Laura Déu y Vanesa Coronado pel seu interès i alegria.*

*A la Dra. Irmgard Costa, del Servei d'Anatomia Patològica de la Corporació Parc Taulí (Hospital General de Sabadell, Barcelona), per la seva apreciable col·laboració en el diagnòstic anatomopatològic de les mostres.*

*A la Dra. María del Carmen Ruiz de Villa, Professora del Departament de Bioestadística de la Universitat de Barcelona, per la seva important col·laboració en el tractament estadístic de les dades i pel continuo interès en aquest treball.*

*Als professors i altres companys de la Unitat de Fisiologia Mèdica per oferir-nos la seva ajuda quan la vam necessitar.*

*A Álvaro González-Coloma, Carlos Sánchez, Fernando López-Segura, Teresa Pérez e Isabel Bombal. Gracias por hacerme partícipe de buenos momentos como los compartidos en Santander y en las visitas al laboratorio.*

*Al Dr. Jesús Ruberte, Professor del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la càlida acollida en el seu laboratori, i als seus col·laboradors, David, Mariana, Vero, Lore i Àngel, per fer-me sentir una més en les innumerables hores davant del microscopi.*

*Als Drs. Miquel Borrás i Joaquim de Lapuente, investigadors del Parc Científic de Barcelona, per la seva desinteressada col·laboració i la seva amabilitat.*

*Al Dr. Xavier Cañas, del Servei d'Experimentació Animal del Parc Científic de Barcelona, per la seva constant ajuda i amabilitat amb els assajos biològics d'aquest treball.*

*Al Dr. Manuel Tena Sempere, Profesor del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, por su asesoramiento y colaboración en la determinación de algunas hormonas analizadas en este trabajo.*

*Al Dr. Juanma Hidalgo, Professor del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i de Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, pel seu assessorament en la recollida de mostra hipotalàmica.*

*Al Dr. José Russo, Senior Member y Professor del Fox Chase Cancer Center, Director del Breast Cancer Research Laboratory y del NCI-NIEHS Breast Cancer and the Environment Research Center, y a la Dra. Irma Russo, Member y Profesora Asociada del Fox Chase Cancer Center y Responsable en la Sección de Endocrinología Molecular del Breast Cancer Research Laboratory. A ambos, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en vuestro laboratorio e introducirme en el mundo del Whole Mount, pero sobre todo gracias por abrirme las puertas de vuestra casa y hacerme sentir como un miembro más de la familia.*

*Al personal del Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la seva col·laboració i simpatia.*

*Als membres del P.A.S. de la Facultat de Medicina i als Vigilants, per la seva cordialitat i professionalitat.*

*Al Javi, l'Anna, el Manu, la Marilisa, la Itxaso i el Miguel per ser els meus pilars, sense els quals perdo la meva pròpia essència.*

*Moltes gràcies Javi per oferir-me la teva generosa amistat incondicional, pels milers de consells i ànims en tots els aspectes de la meva vida. Saps que aquesta piltrafilla no hagués acabat la carrera, en gran part, sense el teu recolzament??? I mira on sóc ara!! Què fort! Merci macu, de debò... I gràcies també a la Marta! Merci guapa pels ànims i els consells!!*

*Moltes gràcies Anna. No sé què dir-te que no sàpigués ja... si ets com ma germana!! Mira que fa anys que ens coneixem i hem compartit de tot... des de feina a la piscina, passant per cafès del poble, penes, alegries, bodes ...fins i tot has patit la meva tesi!! i sempre juntes!! Merci per intentar entendre'm i recolzar-me sempre fes el que fes!! I gràcies també el Joan per intentar posar a lloc la meva esquena i pels diferents moments, música inclosa, que hem viscut junts!!*

*Moltes gràcies al Manu perquè d'unes birres a la Palmera i al Croquet, hem arribat a ser capaços de mirar-nos i entendre'ns sense necessitat de paraules, compartint de tot, inclús moments memorables com el "Comfortably Numb". Gràcies per ser allà sempre, donant-me suport. I gràcies a la Mari! Una persona d'allò més especial i encantadora que ha tret temps de on no tenia per a dibuixar la portada d'aquesta tesi. Moltes gràcies guapíssima!!*

*I moltes gràcies a la Marilisa, la Itxaso i el Miguel perquè ells son com una família per mi que es va trobar per Sardenya i va anar a petar a Vallcarca. Gràcies per haver compartit moments tant intensos, com alegres*

*i emocionals que m'han portat al centre més pur del propi jo. Què més dir? A part de gràcies pels consells, pels ànims i per tot allò que em transmeteu. Sou tan genials com únics!!*

*Gràcies també a la Rosa, Fol y Alaitz. Merci pels bons moments, per les birres, festes i cafès, i per compartir infinites hores de classes, bar i biblioteca. I perquè malgrat el pas del temps i les vides, quan ens retrobem sembla que els anys no hagin passat.*

*Al Marc L, per ser un bon amic... d'aquells que en diuen literalment de la infantesa. Gràcies per ser allà i recolzar-me sempre en aquesta bogeria de la tesi...*

*A la colla Zitiús & Co., Crsitian, Pejo, Nuspa, Víctor, Lucas, Cristina, Natalia (la única que realmente entienda la locura de una tesis!), Carlitos, Xavi, Jaume, Judit, Guido, Óscar, Mikel i Gis per tots els moments viscuts de futbol, birres, concerts de Black Rose i Blackbeltones, cinemes, sortides en moto etc... Gràcies per tots els somriures que m'heu provocat!! I de tots ells, muy especialmente a Julio, del que guardo como un valioso tesoro todo el tiempo que compartimos. Si esta tesis ha llegado a su fin es en gran parte gracias a tu apoyo incondicional... Muchas gracias guapo!!*

*No em puc oblidar tampoc de tota la colla que va des de la UB fins a la Plana, moltes gràcies a la Nuriakg, Guillem, al recent incorporat iBlue, Santi noia, Dani, Moi, Vaqué i la Coll... Merci macus pels riures i vells compartits a casa d'uns i els altres, al Jamón Canario, al Pollo Rico o a festes per Vic i SPT. Gràcies per escoltar i donar consells de tota mena i fer que al tornar a casa no deixés de somriure en pensar en els moments viscuts junts!*

*A la meva altra gran família, la del K1. Sou un munt i segur que em deixo algú... però gràcies a la Bet, Gerard, Maite, David, Maria, Joan, Ignasi, Cesc, Laia, Marc A., Ferran, Berta, Sara, Yeray, Laura E., Àlex i un llarg etc!! Moltes gràcies perquè junts hem viscut i après un munt de coses fent-nos millors persones... Records de caus, excursions i campaments que no se m'oblidaran allà on vagi, i és que la gent de cau som així... I em permeto la llicència de donar les gràcies apart a les famílies Abad i Llussà. Gràcies per tots els sopars organitzats i pels tapers que m'heu donat!!*

*A tota la gent de Sant Andreu de la Barca que malgrat fa poc que formen part del meu món, s'han convertit en una part molt important. Mil gràcies a la meva fantàstica sogra, la Montse, als meus no menys fantàstics cunyats, la Neus i el Paco, a les peques de la casa, la Júlia i la Berta, i als "primus", Albert i Meri. I de Sant Andreu tampoc em puc oblidar de la colla dels Zascandiles, merci a tots nois!!, i en especial al Miki, moooltes gràcies pel disseny del punt de llibre i per la currada de la portada!! Espero no haver-te atabalat gaire!!*

*A la meva família, aquella no implicada en la ciència però que en rep les conseqüències. Gràcies Mare per ser allà sempre malgrat els meus mal humors pel cansament o les absències. Et dec mil favors i mil moments per a compartir. T'estimo molt!! Moltes gràcies també als meus avis i al tiet Sergi (la tesi es mereix una mona extra???) i a la resta de la família, aquells que m'han vist créixer i de la mateixa manera que a la mare... us dec molts moments!! Moltes gràcies per entendre-ho i recolzar-me en tot moment!!*

*I finalment, al Jaume (i el Truc!). Moltes gràcies per no tenir prou amb la felicitat i exigir eufòria. Gràcies per anar conformant cada dia es meu amor de blanca pell.*



## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
A. <u>DESARROLLO, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA</u>	3
B. <u>CÁNCER DE MAMA</u>	8
1. FACTORES ENDOCRINOS	9
2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS	12
3. FACTORES AMBIENTALES	16
C. <u>MODELO EXPERIMENTAL</u>	18
D. <u>LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA</u>	23
1. INFLUENCIA SOBRE LAS ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS	24
2. INFLUENCIA SOBRE LOS NIVELES HORMONALES	25
3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR	26
4. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	29
5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA	30
6. INFLUENCIA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	31
7. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	32
E. <u>MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA CARCINOGENESIS MAMARIA</u>	34
1. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL	34
2. RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS	41
2.1 Aspectos Generales	41
2.1.1. Hormonas Esteroideas	41
2.1.2. Receptores de Hormonas Esteroideas	42
2.2. Expresión de RE y RP en Glándula Mamaria	45
2.3. Expresión de RE y RP en Cáncer de Mama	47
2.4. Lípidos de la Dieta, Receptores Esteroideos y Cáncer de Mama	49
3. ESTRÉS OXIDATIVO	50
3.1. Definición de Estrés Oxidativo	50
3.2. Concepto de Radical Libre. Tipos	51
3.3. Sistemas Antioxidantes Enzimáticos de la Célula	51
3.3.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	52
3.3.2. Glutatión Peroxidasa (GPx)	54
3.3.3. Catalasa (CAT)	55
3.4. Sistemas Antioxidantes No Enzimáticos de la Célula	55
3.5. Consecuencias del Estrés Oxidativo	56
3.5.1. Daño Oxidativo en el ADN	57
3.5.2. Daño Oxidativo en Lípidos. Peroxidación Lipídica	57
3.5.3. Daño Oxidativo en Proteínas	61
3.6. Estrés oxidativo y Mecanismos de la Carcinogénesis	61
4. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA	63
F. <u>OBJETIVOS</u>	67
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>69</b>
A. <u>ENSAYOS BIOLÓGICOS</u>	71
1. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES	71
2. DIETAS EXPERIMENTALES	71
3. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS	76
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	76
5. EXPLORACIONES PERIÓDICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA	78

<b>B. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS</b>	82
1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES	82
2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA ( <i>WHOLE MOUNT</i> )	83
3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y ENDOMETRIO	84
4. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS NIVELES DE LIPOFUSCINA EN HÍGADO	84
5. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES RE $\alpha$ Y RE $\beta$	85
<b>C. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	86
1. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE HORMONAS	87
2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	88
2.1. Extracción de ARN total	88
2.2. Extracción de ADN total	89
3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ( <i>MICROARRAYS</i> )	90
4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL ( <i>Real Time- PCR</i> )	91
5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES	93
6. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO	95
6.1. Determinación de la Actividad de Enzimas Antioxidantes	95
6.1.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	95
6.1.2. Glutación Peroxidasa (GPx)	96
6.1.3. Catalasa (CAT)	97
6.2. Análisis de los Niveles de Glutación	98
6.2.1. Determinación de GSH	98
6.2.2. Determinación de GSSG	98
6.3. Análisis de los Niveles de F <sub>2</sub> -IsoP en Plasma	99
6.4. Detección del Nivel de Daño en el ADN	100
6.4.1. Ensayo Comet	100
6.4.2. Detección de 8-oxo-dG	101
7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LEPTINA ( <i>WESTERN BLOT</i> )	102
<b>D. ANÁLISIS DE DATOS</b>	103
1. ENSAYOS BIOLÓGICOS	103
1.1. Carcinogénesis	103
1.2. Estudio del Crecimiento y la Maduración Sexual	104
2. HISTOLOGÍA, MORFOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	105
3. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	105
4. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA	105
<b>RESULTADOS</b>	<b>107</b>
<b>A. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL</b>	109
1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y MASA CORPORAL	109
1.1. Evolución Ponderal	109
1.2. Expresión de Genes que Regulan el Metabolismo de Lípidos	111
1.2.1. Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )	111
1.2.2. Carnitina Palmitoil Transferasa tipo 1a (CPT-1a)	112
1.2.3. Proteína de Unión a Ácidos Grasos en Hígado (L-FABP)	112
1.2.4. Proteína Desacopladora tipo 2 (UCP-2)	113
2. PUBERTAD	114
2.1. Clínica	114
2.1.1. Apertura Vaginal	114
2.1.2. Ciclo Estral	116
2.2. Función Ovárica y Endometrial	117
2.3. Caracterización Molecular	117
2.3.1. Inicio de la Pubertad	117
2.3.2. Leptina y su Receptor	118
3. ESTADO HORMONAL	119
3.1. Niveles Plasmáticos Hormonales	119

3.1.1. LH y FSH .....	119
3.1.2. Estradiol .....	120
3.1.3. Progesterona .....	121
3.2. Expresión del ARNm en los Receptores Hormonales en Glándula Mamaria .....	122
3.2.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ) .....	122
3.2.2. Receptor de Estrógenos $\beta$ 1 y $\beta$ 2 (RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2) .....	122
3.2.3. Relación RE $\alpha$ y RE $\beta$ total .....	123
3.2.4. Receptor de Progesterona (RP) .....	124
3.3. Expresión de Proteína de los Receptores Hormonales RE $\alpha$ y RE $\beta$ en Glándula Mamaria .....	125
3.3.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ) .....	125
3.3.2. Receptor de Estrógenos $\beta$ (RE $\beta$ ) .....	126
3.3.3. Relación RE $\alpha$ y RE $\beta$ total .....	127
4. CARACTERÍSTICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA .....	128
4.1. Morfología ( <i>Whole Mount</i> ) .....	128
4.1.1. Estructuras Epiteliales Normales .....	128
4.1.2. Densidad de la Glándula Mamaria .....	131
4.2. Diferenciación Molecular de la Glándula Mamaria .....	132
4.3. Hormonas y Receptores relacionados con Lípidos y Desarrollo de la Glándula Mamaria .....	134
4.3.1. Leptina y su Receptor .....	134
4.3.2. Adiponectina .....	134
4.3.3. Relación Leptina y Adiponectina .....	135
4.3.4. Receptor Activado de Proliferación de Peroxisomas tipo $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) .....	136
<b>B. CARCINOGENESIS</b> .....	136
1. PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS .....	136
1.1. Clasificación Histopatológica .....	136
1.2. Grado Histopatológico de los Tumores Mamaros .....	137
2. PARÁMETROS CLÍNICOS .....	141
2.1. Tiempo de Latencia .....	141
2.2. Incidencia .....	143
2.3. Contenido Tumoral .....	144
2.4. Volumen Tumoral .....	147
3. ESTUDIO MORFOLÓGICO ( <i>WHOLE MOUNT</i> ) DE LAS ESTRUCTURAS PROLIFERATIVAS ANÓMALAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA .....	150
4. RECEPTORES HORMONALES .....	152
4.1. Expresión del ARNm en Adenocarcinomas Mamaros .....	152
4.1.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ) .....	152
4.1.2. Receptor de Estrógenos $\beta$ 1 y $\beta$ 2 (RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2) .....	153
4.1.3. Relación RE $\alpha$ y RE $\beta$ total .....	153
4.1.4. Receptor de Progesterona (RP) .....	154
4.2. Expresión de la Proteína en Adenocarcinomas Mamaros .....	154
4.2.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ) .....	154
4.2.2. Receptor de Estrógenos $\beta$ (RE $\beta$ ) .....	155
4.2.3. Relación RE $\alpha$ y RE $\beta$ total .....	155
5. HORMONAS Y RECEPTORES RELACIONADOS CON LÍPIDOS Y CÁNCER DE MAMA .....	156
5.1. Leptina y su Receptor .....	156
5.2. Adiponectina .....	157
5.3. Relación Leptina y Adiponectina .....	157
5.4. Receptor Activado de Proliferación de Peroxisomas tipo $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) .....	158
<b>C. MECANISMOS MOLECULARES DE LA CARCINOGENESIS</b> .....	158
1. ESTRÉS OXIDATIVO .....	158
1.1. Enzimas Antioxidantes .....	158
1.1.1. Expresión del ARNm en Glándula Mamaria .....	158
1.1.2. Actividad de la Proteína en Glándula Mamaria .....	163
1.1.3. Expresión del ARNm en Adenocarcinomas Mamaros .....	165
1.1.4. Actividad de la Proteína en Adenocarcinomas Mamaros .....	169

1.2. Capacidad Antioxidante No Enzimática .....	172
1.2.1. Niveles de GSSG y GSH en Glándula Mamaria .....	172
1.2.2. Niveles de GSSG y GSH en Adenocarcinomas Mamarios .....	174
1.2.3. Niveles de GSR en Glándula Mamaria .....	176
1.2.4. Niveles de GSR en Adenocarcinomas Mamarios .....	177
1.3. Productos de Peroxidación Lipídica .....	177
1.3.1. Niveles Plasmáticos de F <sub>2</sub> -IsoP .....	177
1.3.2. Niveles Hepáticos de Lipofuscina .....	178
1.4. Daño Genómico .....	179
1.4.1. Niveles de 8-oxo-dG en Glándula Mamaria .....	179
1.4.2. Niveles de 8-oxo-dG en Adenocarcinomas Mamarios .....	180
1.4.3. Ensayo Comet en Glándula Mamaria .....	181
1.4.4. Ensayo Comet en Sangre .....	181
2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	182
2.1. Genes Diferencialmente Expresados por Efecto de los Lípidos de la Dieta .....	182
2.1.1. Glándula Mamaria .....	182
2.1.2. Adenocarcinomas Mamarios .....	184
2.2. Categorías Funcionales de los Genes Diferencialmente Expresados por Efecto de los Lípidos de la Dieta .....	186
2.2.1. Glándula Mamaria .....	186
2.2.2. Adenocarcinomas Mamarios .....	190
2.3. Validación del Estudio del Perfil de Expresión Génica .....	192
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>197</b>
<b>A. <u>CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL</u> .....</b>	<b>199</b>
1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y MASA CORPORAL .....	199
2. PUBERTAD .....	203
3. ESTADO HORMONAL .....	207
4. CARACTERÍSTICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA .....	210
<b>B. <u>CARCINOGENESIS</u> .....</b>	<b>215</b>
1. PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS .....	215
2. PARÁMETROS CLÍNICOS .....	216
3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA NEOPLÁSICA .....	222
4. RECEPTORES HORMONALES .....	223
5. HORMONAS Y RECEPTORES RELACIONADOS CON LÍPIDOS Y CÁNCER DE MAMA .....	225
<b>C. <u>MECANISMOS MOLECULARES DE LA CARCINOGENESIS</u> .....</b>	<b>227</b>
1. ESTRÉS OXIDATIVO COMO MECANISMO DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA .....	227
1.1. Capacidad Antioxidante .....	227
1.2. Daño Oxidativo .....	234
1.3. Balance del Estudio del Estrés Oxidativo .....	238
2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	239
<b>D. <u>BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS</u> .....</b>	<b>251</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>257</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>263</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>303</b>

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara .....	5
<b>Figura 2.</b> Estructuras epiteliales de la glándula mamaria .....	6
<b>Figura 3.</b> Topografía de la glándula mamaria de rata .....	7
<b>Figura 4.</b> Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres.....	9
<b>Figura 5.</b> Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno (DMBA).....	19
<b>Figura 6.</b> Esquema de la neurobiología del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal .....	37
<b>Figura 7.</b> Sistemas antioxidantes celulares .....	52
<b>Figura 8.</b> Ejemplos de productos finales de la peroxidación lipídica a partir de hidroperóxidos lipídicos.....	58
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental.....	77
<b>Figura 10.</b> Imágenes representativas de la categorización de la apertura vaginal.....	80
<b>Figura 11.</b> Exploraciones periódicas de los animales .....	80
<b>Figura 12.</b> Método de obtención de extractos proteicos celulares .....	94
<b>Figura 13.</b> Imagen representativa del ensayo Comet .....	100
<b>Figura 14.</b> Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales de los diferentes grupos experimentales .....	110
<b>Figura 15.</b> Índices de masa corporal en función de la dieta a diferentes edades.....	110
<b>Figura 16.</b> Masa corporal de los animales de los grupos experimentales al final del estudio (246 días).....	111
<b>Figura 17.</b> Expresión relativa del ARNm de PPAR $\alpha$ en muestras de hígado de los animales de los diferentes grupos experimentales.....	112
<b>Figura 18.</b> Expresión relativa del ARNm de CPT-1a en muestras de hígado de los animales de los diferentes grupos experimentales.....	112
<b>Figura 19.</b> Expresión relativa del ARNm de L-FABP en muestras de hígado de los animales de los diferentes grupos experimentales.....	113
<b>Figura 20.</b> Expresión relativa del ARNm de UCP-2 en muestras de hígado de los animales de los diferentes grupos experimentales .....	113
<b>Figura 21.</b> Estudio del estado de apertura vaginal.....	114
<b>Figura 22.</b> Distribución de los animales (%) en cada uno de los estados de maduración a lo largo del tiempo.....	115
<b>Figura 23.</b> Mediana del día y peso al inicio en cada estado de maduración sexual .....	116
<b>Figura 24.</b> Expresión relativa del ARNm de Kisspeptina y GPR54 en hipotálamo de los grupos experimentales a diferentes edades .....	118
<b>Figura 25.</b> Detección por <i>Western Blot</i> de los niveles de Leptina en plasma y expresión relativa del ARNm de ObR en hipotálamo de los grupos experimentales en edad peripuberal .....	119
<b>Figura 26.</b> Niveles plasmáticos de LH y FSH de los grupos experimentales en edad peripuberal.....	120
<b>Figura 27.</b> Niveles plasmáticos de Estradiol de los grupos experimentales a diferentes edades .....	121
<b>Figura 28.</b> Niveles plasmáticos de Progesterona de los grupos experimentales a diferentes edades.....	121
<b>Figura 29.</b> Expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$ en glándula mamaria de los diferentes grupos experimentales a diferentes edades .....	122
<b>Figura 30.</b> Expresión relativa del ARNm de RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	123

<b>Figura 31.</b> Relación entre la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$ y RE $\beta$ en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	124
<b>Figura 32.</b> Expresión relativa del ARNm de RP en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	124
<b>Figura 33.</b> Índice de positividad de RE $\alpha$ en TEB de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	125
<b>Figura 34.</b> Índice de positividad de RE $\alpha$ en ductos y lóbulos de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	126
<b>Figura 35.</b> Índice de positividad de RE $\beta$ en TEB, ductos y lóbulos de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	127
<b>Figura 36.</b> Identificación de las distintas estructuras epiteliales normales en glándula mamaria .....	128
<b>Figura 37.</b> Número de estructuras epiteliales normales de la glándula mamaria a lo largo del tiempo .....	129
<b>Figura 38.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 36 y 51 días .....	129
<b>Figura 39.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 100 días .....	130
<b>Figura 40.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días .....	130
<b>Figura 41.</b> Expresión relativa del ARNm de $\beta$ -Caseína en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	132
<b>Figura 42.</b> Expresión relativa del ARNm de Leptina y su receptor en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	134
<b>Figura 43.</b> Expresión relativa del ARNm de Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	135
<b>Figura 44.</b> Relación entre la expresión relativa del ARNm de Leptina y Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	135
<b>Figura 45.</b> Expresión relativa del ARNm de PPAR $\gamma$ en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	136
<b>Figura 46.</b> Número de mitosis en 10 campos de gran aumento (400X).....	138
<b>Figura 47.</b> Distribución de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio según el índice Scarff-Bloom-Richardson .....	140
<b>Figura 48.</b> Imágenes histológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales .....	140
<b>Figura 49.</b> Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	144
<b>Figura 50.</b> Contenido Tumoral Total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	145
<b>Figura 51.</b> Contenido Tumoral Medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	146
<b>Figura 52.</b> Volumen Tumoral Total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	148
<b>Figura 53.</b> Volumen Tumoral Medio por Animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	149

<b>Figura 54.</b> Volumen Tumoral Medio por Tumor de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.....	150
<b>Figura 55.</b> Estructuras proliferativas anómalas identificadas en la glándula mamaria de los animales de los diferentes grupos experimentales .....	150
<b>Figura 56.</b> Número de estructuras proliferativas anómalas por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días.....	152
<b>Figura 57.</b> Expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$ en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	152
<b>Figura 58.</b> Expresión relativa del ARNm de RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2 en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	153
<b>Figura 59.</b> Relación entre la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$ y RE $\beta$ en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	153
<b>Figura 60.</b> Expresión relativa del ARNm de RP en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	154
<b>Figura 61.</b> Índice de positividad de RE $\alpha$ en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	154
<b>Figura 62.</b> Índice de positividad de RE $\beta$ en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	155
<b>Figura 63.</b> Índice de positividad de la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	155
<b>Figura 64.</b> Expresión relativa del ARNm de Leptina y su receptor en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	156
<b>Figura 65.</b> Expresión relativa del ARNm de Adiponectina en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	157
<b>Figura 66.</b> Relación entre la expresión relativa del ARNm de Leptina y Adiponectina en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	157
<b>Figura 67.</b> Expresión relativa del ARNm de PPAR $\gamma$ en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.....	158
<b>Figura 68.</b> Expresión relativa del ARNm de CuZnSOD y MnSOD en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	159
<b>Figura 69.</b> Expresión relativa del ARNm de SOD total (CuZnSOD+MnSOD) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	159
<b>Figura 70.</b> Expresión relativa del ARNm de cGPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	160
<b>Figura 71.</b> Expresión relativa del ARNm de PHGPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	160
<b>Figura 72.</b> Expresión relativa del ARNm de GPx total (cGPx+PHGPx) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	161
<b>Figura 73.</b> Expresión relativa del ARNm de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	161

<b>Figura 74.</b> Perfil de expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y Catalasa en la glándula mamaria de los grupos experimentales a 36, 51, 100 y 246 días de edad.....	162
<b>Figura 75.</b> Niveles de actividad de CuZnSOD en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	163
<b>Figura 76.</b> Niveles de actividad de SOD total en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	164
<b>Figura 77.</b> Niveles de actividad de GPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	164
<b>Figura 78.</b> Niveles de actividad de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	165
<b>Figura 79.</b> Expresión relativa del ARNm de CuZnSOD y MnSOD en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	165
<b>Figura 80.</b> Expresión relativa del ARNm de SOD total (CuZnSOD+MnSOD) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.....	166
<b>Figura 81.</b> Expresión relativa del ARNm de cGPx y PHGPx en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	166
<b>Figura 82.</b> Expresión relativa del ARNm de GPx total (cGPx+PHGPx) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	167
<b>Figura 83.</b> Expresión relativa del ARNm de CAT en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	167
<b>Figura 84.</b> Perfil de expresión relativa de las enzimas antioxidantes SOD, Catalasa y GPx en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.....	168
<b>Figura 85.</b> Expresión relativa del ARNm de las enzimas antioxidantes en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio .....	169
<b>Figura 86.</b> Niveles de actividad CuZnSOD en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	170
<b>Figura 87.</b> Niveles de actividad SOD total en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	170
<b>Figura 88.</b> Niveles de actividad GPx en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	170
<b>Figura 89.</b> Niveles de actividad Catalasa en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio .....	171
<b>Figura 90.</b> Niveles de actividad de las enzimas antioxidantes en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio .....	172
<b>Figura 91.</b> Niveles de GSSG en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	172
<b>Figura 92.</b> Niveles de GSH en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	173
<b>Figura 93.</b> Relación entre los niveles de GSSG y GSH en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	174
<b>Figura 94.</b> Niveles de glutatión en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales.....	175

<b>Figura 95.</b> Relación entre los niveles de GSSG y GSH en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales.....	175
<b>Figura 96.</b> Niveles de glutatión en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio.....	176
<b>Figura 97.</b> Expresión relativa del ARNm de GSR en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	176
<b>Figura 98.</b> Expresión relativa del ARNm de GSR en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.....	177
<b>Figura 99.</b> Niveles de F <sub>2</sub> -IsoP libres en plasma de animales de los grupos experimentales a diferentes edades.....	178
<b>Figura 100.</b> Imagen representativa de la detección de lipofuscina mediante la tinción de Schmorl en hígado de rata.....	178
<b>Figura 101.</b> Niveles de lipofuscina en hígado de los grupos experimentales al final del estudio.....	179
<b>Figura 102.</b> Niveles de 8-oxo-dG en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	179
<b>Figura 103.</b> Niveles de 8-oxo-dG en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.....	180
<b>Figura 104.</b> Niveles de 8-oxo-dG en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio.....	180
<b>Figura 105.</b> Ensayo Comet en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	181
<b>Figura 106.</b> Ensayo Comet en muestras de sangre de animales de los grupos experimentales a diferentes edades.....	181
<b>Figura 107.</b> Imágenes representativas del ensayo Comet.....	182
<b>Figura 108.</b> Número de genes diferencialmente expresados en glándula mamaria en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica respecto al grupo control a diferentes edades.....	183
<b>Figura 109.</b> Diagramas de Venn de genes específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica en glándula mamaria a diferentes edades.....	184
<b>Figura 110.</b> Número de genes diferencialmente expresados en adenocarcinomas mamarios de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica respecto al grupo control al final del estudio.....	185
<b>Figura 111.</b> Diagramas de Venn de genes específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica en adenocarcinomas mamarios al final del estudio.....	185
<b>Figura 112.</b> Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria a los 36 días de edad.....	188
<b>Figura 113.</b> Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria a los 51 días de edad.....	189
<b>Figura 114.</b> Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria.....	190
<b>Figura 115.</b> Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en adenocarcinomas mamarios al final del estudio.....	192
<b>Figura 116.</b> Análisis de la expresión por <i>Real Time</i> PCR (expresión relativa respecto al transcrito control Hprt, -mediana-) y por <i>Microarrays</i> (valor densitométrico, -media-).....	193
<b>Figura 117.</b> Análisis de la expresión por <i>Microarrays</i> y <i>Real Time</i> PCR en muestras de adenocarcinomas mamarios.....	195

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta) .....	73
<b>Tabla 2.</b> Composición del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados .....	74
<b>Tabla 3.</b> Categorización de la apertura vaginal .....	79
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos utilizados de los niveles de proteína mediante inmunohistoquímica .....	86
<b>Tabla 5.</b> Ensayos TaqMan® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante <i>Real Time</i> -PCR .....	92
<b>Tabla 6.</b> Peso de los animales en los días de debut de cada estado según la dieta .....	116
<b>Tabla 7.</b> Período comprendido (días) entre el día de estado 3 y el primer estro .....	116
<b>Tabla 8.</b> Análisis histológico de la función ovárica de los animales de los grupos experimentales a los 24, 36 y 51 días del estudio .....	117
<b>Tabla 9.</b> Número de muestras con valores de Estradiol superiores e inferiores a la sensibilidad del método (>5pg/ml) de los grupos experimentales al final del estudio .....	120
<b>Tabla 10.</b> Categorización cualitativa de la glándula mamaria en función de la densidad estructural .....	131
<b>Tabla 11.</b> Análisis estadístico del grado de densidad de la glándula mamaria de todos los grupos experimentales .....	132
<b>Tabla 12.</b> Correlación entre los niveles de $\beta$ -Caseína y el grado de densidad en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	133
<b>Tabla 13.</b> Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio .....	137
<b>Tabla 14.</b> Características histopatológicas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio (I) .....	138
<b>Tabla 15.</b> Características histopatológicas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio (II) .....	139
<b>Tabla 16.</b> Distribución de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio según el índice Scarff-Bloom-Richardson .....	139
<b>Tabla 17.</b> Tiempo de aparición del primer tumor de los diferentes grupos experimentales .....	141
<b>Tabla 18.</b> Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales .....	141
<b>Tabla 19.</b> Análisis estadístico del tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales .....	142
<b>Tabla 20.</b> Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	142
<b>Tabla 21.</b> Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales .....	143
<b>Tabla 22.</b> Número de las diferentes estructuras proliferativas anómalas por campo de gran aumento (400X) en la glándula mamaria de los diferentes grupos experimentales a los 100 días .....	151
<b>Tabla 23.</b> Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas en los genes infra- y sobreexpresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria de los diferentes grupos experimentales .....	186
<b>Tabla 24.</b> Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas en los genes infra- y sobreexpresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en adenocarcinomas mamarios al final del estudio .....	191

## TABLAS ANEXO

<b>Anexo Tabla 1.</b> Índices de masa corporal en función de la dieta a diferentes edades .....	305
<b>Anexo Tabla 2.</b> Expresión relativa del ARNm de PPAR $\alpha$ y CPT-1a en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades .....	305
<b>Anexo Tabla 3.</b> Expresión relativa del ARNm de L-FABP y UCP-2 en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades .....	306
<b>Anexo Tabla 4.</b> Expresión relativa del ARNm de Kisspeptina y GPR54 en hipotálamo de los grupos experimentales a diferentes edades .....	306
<b>Anexo Tabla 5.</b> Detección por <i>Western Blot</i> de los niveles de Leptina en plasma y expresión relativa del ARNm de ObR en hipotálamo de los grupos experimentales en edad peripuberal .....	307
<b>Anexo Tabla 6.</b> Niveles plasmáticos de LH y FSH de los grupos experimentales en edad peripuberal .....	307
<b>Anexo Tabla 7.</b> Niveles plasmáticos de Estradiol y Progesterona de los grupos experimentales a diferentes edades .....	308
<b>Anexo Tabla 8.</b> Expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$ en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	308
<b>Anexo Tabla 9.</b> Expresión relativa del ARNm de RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	309
<b>Anexo Tabla 10.</b> Relación entre la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$ y RE $\beta$ en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	309
<b>Anexo Tabla 11.</b> Expresión relativa del ARNm de RP en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	310
<b>Anexo Tabla 12.</b> Índice de positividad de RE $\alpha$ en TEB, ductos y lóbulos de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	310
<b>Anexo Tabla 13.</b> Índice de positividad de RE $\beta$ en TEB, ductos y lóbulos de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	311
<b>Anexo Tabla 14.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 36 días .....	311
<b>Anexo Tabla 15.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 51 días .....	312
<b>Anexo Tabla 16.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 100 días .....	313
<b>Anexo Tabla 17.</b> Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días .....	314
<b>Anexo Tabla 18.</b> Expresión relativa del ARNm de $\beta$ -Caseína en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	315
<b>Anexo Tabla 19.</b> Expresión relativa del ARNm de Leptina y su receptor en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	315
<b>Anexo Tabla 20.</b> Expresión relativa del ARNm de Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	316
<b>Anexo Tabla 21.</b> Relación entre la expresión relativa del ARNm de Leptina y Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	316

<b>Anexo Tabla 22.</b> Expresión relativa del ARNm de PPAR $\gamma$ en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	317
<b>Anexo Tabla 23.</b> Número de estructuras proliferativas anómalas por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días .....	317
<b>Anexo Tabla 24.</b> Expresión relativa del ARNm de CuZnSOD, MnSOD y SOD total (CuZnSOD+MnSOD) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	318
<b>Anexo Tabla 25.</b> Expresión relativa del ARNm de cGPx, PHGPx y GPx total (cGPx+PHGPx) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	319
<b>Anexo Tabla 26.</b> Expresión relativa del ARNm de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	320
<b>Anexo Tabla 27.</b> Niveles de actividad de CuZnSOD y SOD total en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	320
<b>Anexo Tabla 28.</b> Niveles de actividad de GPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	321
<b>Anexo Tabla 29.</b> Niveles de actividad de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	321
<b>Anexo Tabla 30.</b> Niveles de GSSG, GSH y la relación GSSG/GSH en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	322
<b>Anexo Tabla 31.</b> Expresión relativa del ARNm de GSR en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	323
<b>Anexo Tabla 32.</b> Niveles de F <sub>2</sub> -IsoP libres en plasma de animales de los grupos experimentales a diferentes edades .....	323
<b>Anexo Tabla 33.</b> Niveles de 8-oxo-dG en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades .....	324
<b>Anexo Tabla 34.</b> Ensayo Comet en glándula mamaria y muestras de sangre de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades .....	324
<b>Anexo Tabla 35.</b> Genes diferencialmente expresados por efecto de los lípidos de la dieta, en glándula mamaria, implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés .....	325
<b>Anexo Tabla 36.</b> Genes diferencialmente expresados, específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica, en glándula mamaria implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés .....	333
<b>Anexo Tabla 37.</b> Genes diferencialmente expresados por efecto de los lípidos de la dieta, en adenocarcinomas mamaros, implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés .....	337
<b>Anexo Tabla 38.</b> Genes diferencialmente expresados, específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica, en adenocarcinomas mamaros implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés .....	339

## ABREVIATURAS

C	grupo experimental control (dieta normolipídica)
M <sub>IP</sub>	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz desde el destete
M <sub>P</sub>	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz desde la inducción con DMBA
O <sub>IP</sub>	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen desde el destete
O <sub>P</sub>	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen desde la inducción con DMBA
Dieta m3	dieta experimental normolipídica
Dieta M20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de maíz
Dieta mO20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra
8-oxo-dG	8-oxo-deoxiguanosina
AA	ácido araquidónico
AB	yema alveolar
AdipoQ	adiponectina
AdipoR	receptor de adiponectina
ADN	ácido deoxiribonucleico
ADNc	ácido deoxiribonucleico complementario
ARC	núcleo hipotalámico arcuato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
AVPV	núcleo hipotalámico anteroventral paraventricular
BEA	“buffer of enzymatic activity”
BEA'	“buffer of enzymatic activity with DTT”
BRCA	“breast cancer”
BSA	albúmina sérica bovina
CAT	catalasa
CDK	kinasa dependiente de ciclina
Cdkn2b	“cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
c/EBPb	“CCAAT/enhancer-binding protein B”
CGA	campo de gran aumento
cGPx	glutación peroxidasa citosólica
CLA	ácido linoleico conjugado
COX	ciclooxigenasa
CPT-1a	carnitina palmitoil transferasa tipo 1
Ct	“cycle threshold”
CuZnSOD	SOD citosólica
CYP	citocromo P450
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
DAPI	“4,6-diamino-2-phenylindole dihydrachloride hydrate”
DHA	ácido docosahexaenoico
DMBA	7,12-dimetilbenz-( $\alpha$ )antraceno
DMBADE	7,12-dimetilbenz[ $\alpha$ ]antraceno-3,4-diol-1,2-epóxido
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	dithiothreitol

## Índice

Dyn	dinorfina
E <sub>2</sub>	17β-estradiol
ECSOD	SOD extracelular
EDTA	ácido etilén-diamino-tetracético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del EGF
EGTA	Ácido tetracético etilenglicol
EPA	ácido eicosapentaenoico
ERE	elemento de respuesta a estrógenos
ERK	“extracellular signal-regulated kinase”
FABP	proteína de transporte de ácidos grasos
FDNB	fluronitrobenceno
FFA	ácido grasos libres
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
Fhl1	“four and a half lim domains protein 1”
FSH	hormona estimulante del folículo
γ-GCS	γ-glutamylcisteína sintetasa
Gjal	“gap junction α 1”
GLA	ácido gamma linoleico
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
GO	gene onthology
GPR54	receptor acoplado a la proteína G 54
GPx	glutación peroxidasa
GSR	glutación-S- reductasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GST	glutación-S-transferasa
H	hiperplasias
HCl	ácido clorhídrico
HHE	4-hidroxi-2-hexenal
HIF	factor inducible por hipoxia
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HNF-4	receptor nuclear hepático 4
HPLC	“high performance liquid chromatography”
Hprt1	hipoxantina guanina fosforibosil transferasa 1
HRE	“hormone response element”
IGF	factor de crecimiento insulínico
IL	interleucina
IMC	índice de masa corporal
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP <sub>3</sub>	inositol-trifosfato
IsoPs	isoprostanos
Jak2	“janus kinase 2”
JNK	quinasa c-jun n-terminal
Kj	Contenido tumoral medio
LA	ácido linoleico
Lep	leptina
L-FABP	proteína de unión a ácidos grasos en hígado
LH	hormona luteinizante

Lob	Lóbulo mamario
LOX	lipooxigenasa
LXR	receptor X hepático
M <sub>1</sub> A	N <sup>6</sup> -(3-oxo-propenil) deoxiadenosina
MAPK	“mitogen-activated protein kinase”
MDA	malondialdehído
MMP	metilproteasas de la matriz
MnSOD	SOD mitocondrial
MUFA	ácido graso monoinsaturado
NaCl	cloruro de sodio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NER	reparación por escisión de nucleótidos
NFκB	factor nuclear κB
NHS	suero normal de caballo
NK	“natural killer”
NKB	Neuroquinina B
NMU	nitrosometilurea
NOS	óxido nítrico sintasa
Notch4	“neurogenic locus notch homolog protein 4”
NPY	Neuropéptido Y
ObR	receptor de leptina
OEA	oleiletanolamida
PA	ácido fosfatídico
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE	prostaglandina E
pGPx	glutación peroxidasa plasmática
PHGPx	glutación peroxidasa fosfolípido hidroperóxido
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina
PI3K	fosfoinositol-3-quinasa
PIDL	proliferaciones intra-ductolobulillares
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PKA	proteína kinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	proteína kinasa C
PLA	fosfolipasa A
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PPAR	receptor activado por proliferadores peroxisomales
pRb	proteína Rb fosforilada
PTPasas	tirosina fosfatasas
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
RA	receptor de andrógeno
RAR	receptor del ácido retinoico
Rb	retinoblastoma
RE	receptor de estradiol
RG	receptor de glucocorticoides
RIN	“RNA integrity number”
RNS	especies reactivas del nitrógeno

## Índice

ROS	especies reactivas del oxígeno
RP	receptor de progesterona
RVD	receptor de vitamina D
RXR	receptor del ácido retinoico
Scd	“stearoyl-CoA desaturase”
SD	Sprague-Dawley
SDS	dodecilsulfato sódico
SERM	“selective estrogen receptor modulators”
Smad1	“mothers against decapentaplegic homolog 1”
SOD	superóxido dismutasa
SREBP	“sterol-regulatory element-binding proteína”
STAT	transductor de señal y activador de la transcripción
T	tumor
TBA	ácido tiobarbitúrico
TD	conductos terminales
TDLU	“terminal duct lobular unit”
TdT	“terminal deoxynucleotidyl transferase”
TEB	“terminal end bud”
TGF	factor de crecimiento transformante
Tj	contenido tumoral total
TNF	factor de necrosis tumoral
TRPV1	receptor de potencial transitorio V1
TRx	tioredoxina
UCP-2	Proteína desacopladora 2
V	volumen tumoral total por grupo
V <sub>A</sub>	volumen tumoral medio por animal
VDUP1	“vitamin D3-upregulated protein 1”
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
V <sub>K</sub>	volumen medio por tumor del grupo
XO	xantina oxidasa

En el listado anterior se encuentran detalladas las abreviaturas más utilizadas en este trabajo.

**INTRODUCCIÓN**

**MATERIAL & MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**



## **A. DESARROLLO, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.**

El desarrollo y la función de la glándula mamaria, ya sea humana o de rata, depende de factores hormonales múltiples y específicos que actúan directa o indirectamente sobre las células diana, así como de componentes de la matriz extracelular y de factores de crecimiento producidos localmente. A continuación se presentan las características diferenciales del desarrollo de la glándula mamaria humana y la de rata.

### **HUMANA**

En humanos, la formación de la estructura tubular de la glándula mamaria se inicia en el tercer mes de embarazo a partir del ectodermo. En el recién nacido, dicha glándula consiste en un sistema rudimentario ramificado de ductos que permanece en estado quiescente hasta la pubertad ([583], [586], [1030], [2633]).

Poco antes de la menarquia, y con el inicio de la maduración folicular en el ovario, el parénquima mamario empieza a desarrollar ductos mamarios primarios y secundarios que terminarán en unas formaciones bulbosas o yemas terminales. Con las primeras ovulaciones se inicia la segunda fase del desarrollo mamario caracterizada por la formación de los lobulillos. En ésta, las formaciones bulbosas dan lugar a las yemas alveolares o ductulillos que se disponen alrededor de un ducto, constituyendo los lobulillos tipo 1, que representan la unidad funcional básica de la mama humana o unidad ductulo-lobulillar terminal (“terminal ductal lobular unit” o TDLU). A partir de esta estructura primaria, se producirá la transición de forma gradual a estructuras más diferenciadas, los lobulillos tipo 2 y 3. La transición de un tipo de lobulillo a otro implica la formación de nuevas yemas alveolares, un incremento en el tamaño de los lobulillos y una disminución en el tamaño de las yemas alveolares.

La diferenciación de la mama como glándula lobulillar se completa después de la menarquia, aunque prosigue a un ritmo que se halla relacionado con la intensidad de los estímulos hormonales durante cada ciclo menstrual y, en especial, durante el embarazo. En cada ciclo menstrual, las estructuras glandulares sufrirán en primer lugar una fase de crecimiento que progresa durante la fase folicular y periovulatoria, alcanzando un máximo en la fase luteal, y a continuación se produce una rápida involución. El balance entre la proliferación y la involución en edades reproductivas tempranas favorece la proliferación, existiendo un aumento del número de células en cada ciclo ovulatorio ([2631], [2633], [2638], [3123], [3332]).

Los cambios cíclicos en los niveles de estrógenos y progesterona ováricos durante cada ciclo menstrual y su acción sinérgica son necesarios para el crecimiento armónico de la glándula mamaria ([2631], [4577]). Asimismo, interviene una compleja secuencia hormonal en la que participan prolactina, insulina, cortisol, tiroxina, hormona del crecimiento y la liberadora de gonadotrofinas (GnRH) ([583], [586], [1030], [2631], [2632], [2639], [3332], [3334], [3372]). El tejido adiposo mamario también posee una influencia significativa sobre el crecimiento y el desarrollo del epitelio glandular, de modo que es necesaria la interacción entre ambos tejidos para que se produzca la morfogénesis normal mamaria ([895], [2633]).

La mama humana adulta normal consta de 15-25 ductos galactóforos que drenan los lóbulos mamaros, constituidos, a su vez, por numerosos lobulillos. Los lobulillos constan de un ducto terminal intralobulillar y múltiples ductulillos rodeados por tejido conectivo intra y perilobulillar. Los ductos galactóforos nacen en el pezón y se ramifican en conductos más delgados que conducen hasta los lobulillos.

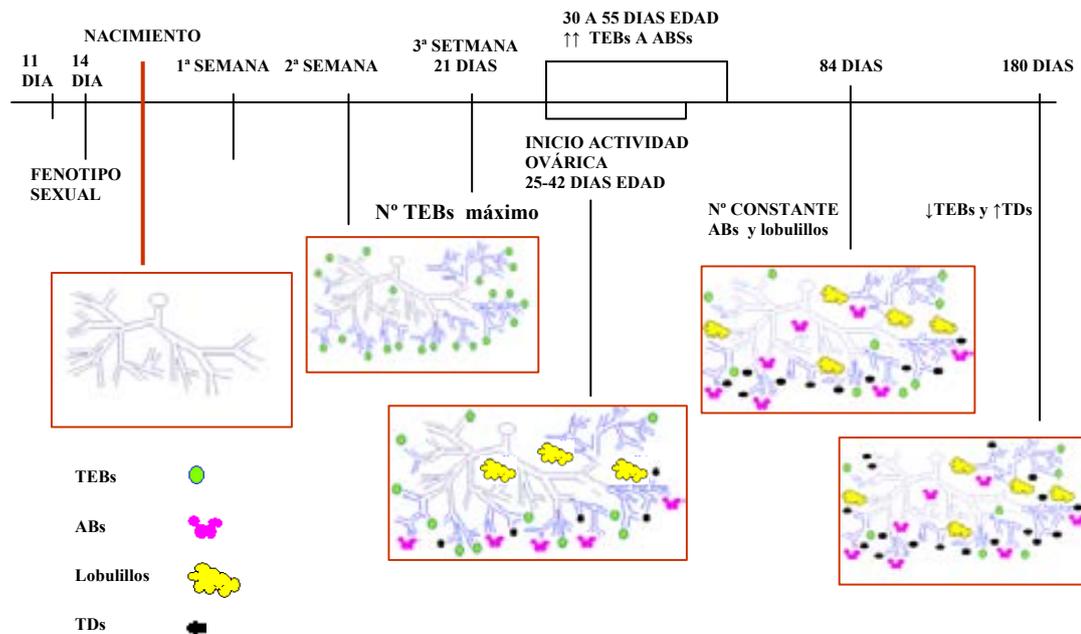
Durante el embarazo se produce la expansión plena del sistema lobulilloalveolar necesaria para la secreción de leche, alcanzando el estado de máxima diferenciación de la glándula mamaria, representado por los lobulillos tipo 4, los cuales presentan capacidad secretora ([453], [583], [1030], [2631], [2632], [2636], [2637], [3503]).

Cuando cesa la lactancia, la glándula mamaria interrumpe rápidamente su actividad secretora y sufre una fase de regresión rápida. Dentro del epitelio alveolar se desarrolla una importante actividad autofágica y lisosomal que elimina los restos celulares. La mayoría de lobulillos tipo 4 regresan, retornando a lobulillos tipo 2 y 3, siendo este último la estructura predominante en las mamas de mujeres pre-menopáusicas multíparas ([3503], [3165]).

Después de la menopausia, la caída de estrógenos y progesterona causa la involución progresiva de los tejidos epitelial y conectivo, así como la atrofia del componente ductulo-lobulillar. La mayoría de los lobulillos adquieren la apariencia morfológica de los tipo 1, y la actividad proliferativa de éstos es menor en glándulas mamaras de mujeres post-menopáusicas multíparas que en las nulíparas, lo que indica que la gestación puede imprimir cambios permanentes en las características biológicas de estas estructuras ([3165], [3923], [3924]).

## RATA

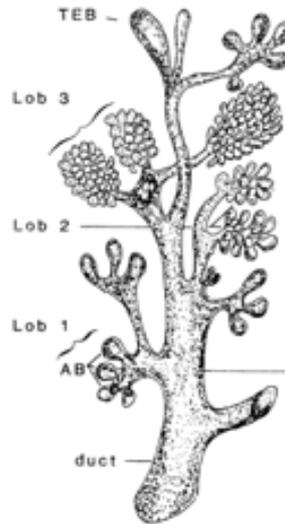
A diferencia de los humanos, la rata posee 6 pares de glándulas mamarias: un par en la región cervical, dos en la región torácica, dos en la abdominal y uno en la inguinal ([1141]). El desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara se esquematiza en la Figura 1.



**Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara.**

El primer esbozo de glándula mamaria aparece en los primeros días de gestación como estructuras de crecimiento alargadas de ectodermo, constituyendo las yemas embrionarias. El crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias será proporcional al resto del cuerpo hasta la pubertad ([3122]). En la rata Sprague-Dawley, la glándula mamaria evoluciona desde un ducto galactóforo mayor primordial que nace del pezón y que se ramifica en ductos secundarios, cuyas longitudes y número de ramas secundarias y terciarias aumentarán con la edad del animal. Hacia la segunda semana de vida, la glándula muestra ductos con ramificaciones que en su extremo presentan las yemas terminales o “terminal end buds” – TEBs – (son el equivalente de las TDLU humanas), considerados los centros de crecimiento activo. El número de TEBs es máximo cuando la rata tiene 21 días de edad. A partir de aquí, coincidiendo con el período prepuberal y el inicio de la actividad ovárica, los TEBs inician la diferenciación y septación a 3 - 5 yemas alveolares (o “alveolar buds” - ABs -). Esta diferenciación progresiva se acentuará en cada ciclo estral. Los ABs, a su vez, y en los

sucesivos ciclos estrales, iniciarán el desarrollo lobulillar, con la aparición de lobulillos tipo 1 y 2 ([3165]). En las ratas vírgenes este proceso continúa durante la maduración sexual ([943]). Un número elevado de TEBs sufrirá hipoplasia en la rata virgen, constituyendo los ductos terminales (TDs). Así, al aumentar la edad del animal, disminuye el número de TEBs y aumenta el de los TDs, mientras que el número de ABs y lobulillos permanecerá estable o disminuirá discretamente hacia los 180 días de edad del animal (Figura 2).



**Figura 2. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria.** Imagen de Russo&Russo, [7671].

Desde el punto de vista histológico, el parénquima mamario de la rata está constituido por unos conductos rectos que se ramifican, rodeados por tejido conjuntivo laxo y fibroadiposo. Los ductos están revestidos por dos capas de células (una interna epitelial y una externa mioepitelial) mientras que los TEBs están constituidos por 4 o 6 capas de células cuboidales epiteliales que presentan un elevado índice de proliferación ([3122]).

La topografía de la glándula mamaria indica que existen diferentes áreas que difieren en su morfología, características cinéticas, respuesta a estímulo hormonal y potencial carcinogénico ([3573]). Estas áreas resultan de dividir en tres tercios el parénquima mamario, a través del eje longitudinal (Figura 3). La zona A es la más cercana al pezón y es donde se encuentran los ductos galactóforos principales y los secundarios. Las ramificaciones de estos últimos se encuentran en la zona B. Finalmente, la zona C presenta un crecimiento activo y es rica en estructuras ductales terminales que acaban en TEBs y TDs. Durante la maduración a ABs, disminuye marcadamente el número de TEBs en las zonas A y B, donde predominan los

lobulillos y los ABs, respectivamente, pero no en la zona C. Aunque todas las glándulas mamarias están constituidas por las tres zonas descritas, la cantidad y el tamaño de cada una de las estructuras morfológicas, así como el área glandular difieren según la localización anatómica. Así, las glándulas torácicas tienen más y mayores TEBs que las abdominales ya que muestran un enlentecimiento en la diferenciación ([3503]), el cual desaparece con la edad de manera que dichas glándulas terminan presentando el grado de desarrollo observado en el resto de localizaciones topográficas ([2952]).

En la glándula mamaria de rata, igual que en la humana, los lobulillos maduran a partir de estructuras menos complejas, los lobulillos tipo 1 (Lob1), con 5-15 ductulillos, a lobulillos tipo 2 (Lob2), con 40-60 ductulillos, y a lobulillos tipo 3 (Lob3), con más de 65-70 ductulillos. El desarrollo glandular dependerá de diversos factores, entre ellos el número de ciclos ocurridos, la dieta y las características genéticas específicas del animal, pero la diferenciación completa de la glándula mamaria se alcanza con el embarazo y la lactancia. Los lobulillos durante la gestación y la lactancia son de tipo 3 y 4. Esta diferenciación es mayor en la zona A que en la B. Aquellos animales que han completado la gestación muestran, además, extenso desarrollo lobulillar en la zona C ([7671]).

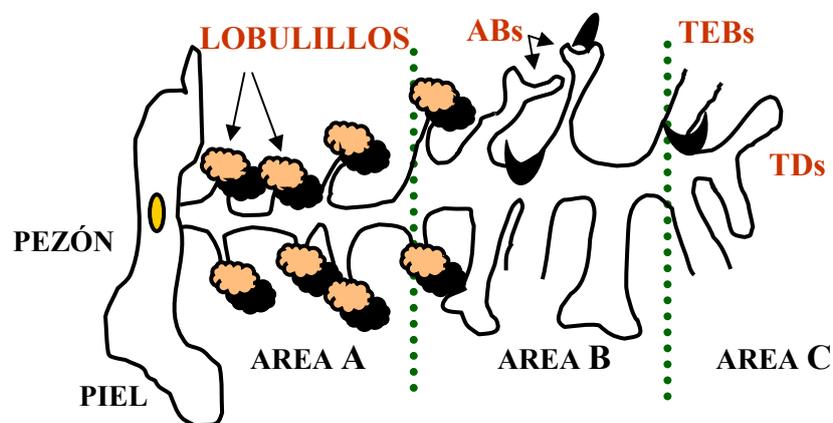


Figura 3. Topografía de la glándula mamaria de rata.

Una vez terminada la lactancia, la glándula mamaria padece una involución pero aún así, su arquitectura restará permanentemente modificada, de manera que presentará un gran número de ABs y lobulillos. Se ha descrito que a los 40-42 días post-destete las glándulas de una rata múltipara, en comparación con las de una rata nulípara, no tienen TEBs y ocasionalmente TDs. El número de ABs es similar, mientras que el de lobulillos es aproximadamente 4 veces mayor que el de una rata virgen adulta.

## **B. CÁNCER DE MAMA.**

Existen dos grandes tipos de patología mamaria: afecciones benignas y tumores malignos. En ambos casos pueden estar localizadas en cualquiera de las distintas estructuras histológicas de la mama, afectando por tanto al epitelio ductal o lobulillar y/o al estroma. La clasificación anatomopatológica del cáncer de mama, basada clásicamente en criterios morfológicos ([576]), se ha complementado con técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular. Así, se ha elaborado una nueva clasificación distinguiendo cuatro tipos de cáncer de mama: 1) luminal A (RE (+), RP (+), HER2 (-)); 2) luminal B (RE (+), RP (+/-), HER2 (+)); 3) *basal-like*, identificado como “triple negativo” (RE (-), RP (-), HER2 (-)); y 4) HER2 (+) ((RE (-), HER2 (+)) ([4593], [4594], [6897])).

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres en todo el mundo ([6691], [7519]) y es el responsable de aproximadamente 1,38 millones de neoplasias diagnosticadas en 2008 (un 23% de todos los tipos de cáncer). Es, además, la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres ([7108]). En los países desarrollados se ha constatado un aumento acelerado de la incidencia en los últimos 20 años, lo cual se ha relacionado con una mayor exposición a factores de riesgo, aunque también deben considerarse otros factores, como la mejora en los métodos diagnósticos que permiten detectar casos que antes quedaban sin registrar correctamente ([4333], [4472], [7519]).

Por otra parte, los estudios epidemiológicos muestran variaciones geográficas importantes de la incidencia del cáncer de mama ([6093], [7108]) (Figura 4). A nivel mundial, las tasas brutas de incidencia más altas corresponden a la población blanca de los Estados Unidos. Los registros poblacionales de Canadá, Israel y diversos países europeos están en la lista de las áreas de tasas de incidencia más elevada, mientras que las más bajas se registran en África y Asia y en la población no judía de Israel.

En España la incidencia es más baja que en otros países de Europa, aunque se ha registrado un aumento del número de casos desde la década de 1980 hasta el año 2000 ([7672]). De hecho, según los últimos datos publicados, en España el cáncer de mama es el que presenta más incidencia y mortalidad ([www.globocan.iarc.fr]). En relación a Cataluña, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años, aunque en el contexto europeo sigue siendo de los más bajos ([7673], [7674]).

El cáncer de mama es un proceso neoplásico de etiología multifactorial y que se desarrolla en múltiples etapas (“multistep”). Diversos factores, actuando de forma simultánea

y/o secuencial, regulan las distintas etapas de la carcinogénesis mamaria. La naturaleza de estos factores es variada y pueden clasificarse en: endocrinos, genéticos y ambientales.

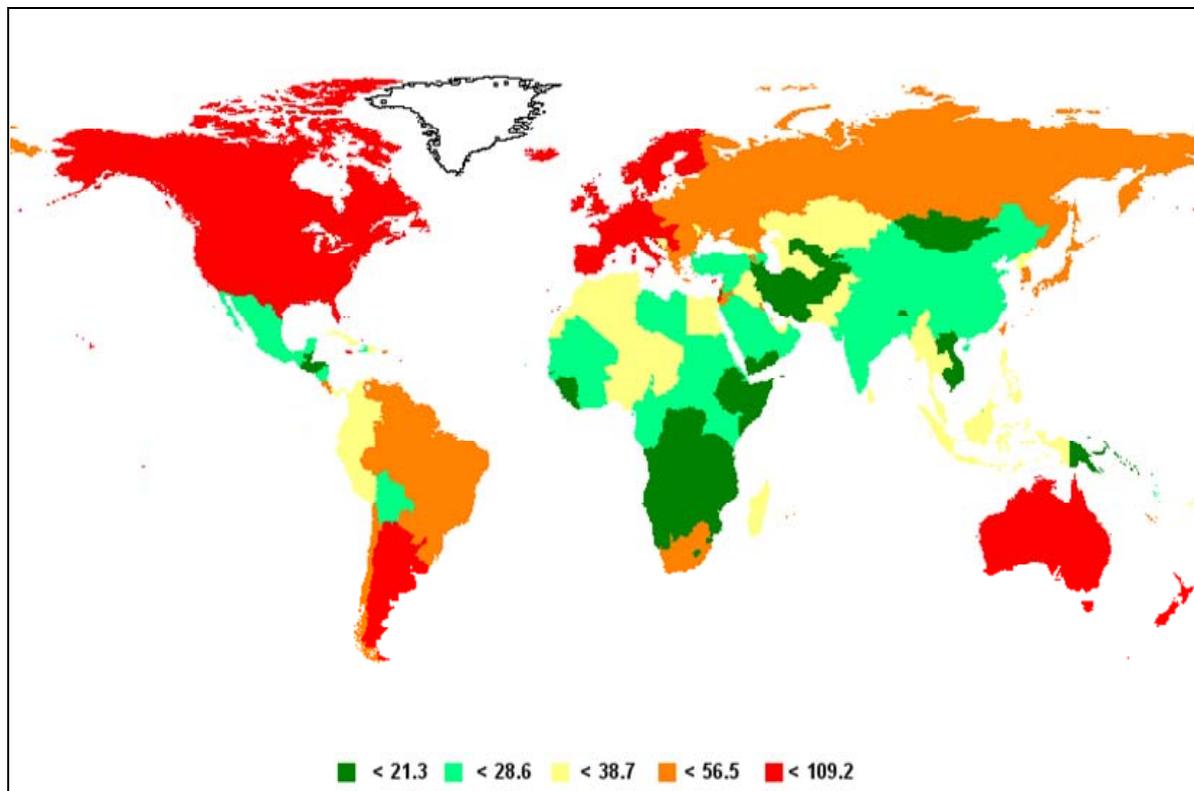


Figura 4. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres. Globocan, 2008 ([7108]).

## 1. FACTORES ENDOCRINOS.

La etiología y progresión del cáncer de mama tienen un fuerte componente hormonal. Así, los estrógenos, fundamentalmente estradiol y estrona, y los andrógenos, a concentraciones fisiológicas, estimulan la proliferación de las células tumorales mamarias. Las dosis farmacológicas de progesterona, la insulina y la prolactina, también ejercen un efecto estimulador. En cambio, los estrógenos y los andrógenos a dosis farmacológicas y las dosis fisiológicas de progesterona son inhibidores. Las maniobras terapéuticas ablativas como la ovariectomía, la hipofisectomía y la adrenalectomía, provocan la regresión tumoral. El embarazo ejerce un efecto protector si precede a la transformación de la glándula mamaria y un efecto estimulador si es posterior. El efecto protector del embarazo, así como el de la gonadotropina coriónica humana, está relacionado con la diferenciación de la glándula asociada con la depresión de la proliferación celular y la síntesis de inhibina por las células

epiteliales mamarias ([2406], [3370]). Por otro lado, en mujeres postmenopáusicas, la fuente de estrógenos es el tejido adiposo. En éste, un sistema enzimático de aromatasas convierte los andrógenos, secretados por la glándula adrenal, en estrógenos. Por lo tanto, mujeres con un incremento en la grasa corporal presentarían niveles incrementados de estrógenos y un mayor riesgo de padecer cáncer de mama ([4595]).

Diversos trabajos experimentales demuestran que los estrógenos desempeñan una función en la iniciación, promoción y desarrollo del cáncer de mama. Clásicamente se ha considerado que estas hormonas ejercían un papel en la carcinogénesis mamaria fundamentalmente como promotoras, pero también podrían actuar en la iniciación como cocarcinógenos, potenciando o facilitando la acción del agente carcinogénico ([2363], [3326]). En este sentido, se ha descrito un aumento en la tasa de proliferación por acción de los estrógenos, de manera que estas hormonas pueden aumentar la proliferación de células susceptibles a carcinógenos, o pueden promover que un clon de células iniciadas se desarrolle en un tumor detectable ([3321], [3326], [4505]). Se ha indicado que los estrógenos son agentes genotóxicos ya que pueden inducir daño en el ADN y mutaciones en los genes, directamente a través de sus metabolitos, y/o indirectamente, mediante la síntesis de especies oxígeno reactivas (“reactive oxygen species”, ROS) ([4680]). Los radicales libres, como ROS, se encuentran involucrados en el proceso carcinogénico produciendo daño oxidativo en las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN). Este tema se encuentra ampliamente detallado en el subapartado E.3.2 de este capítulo.

La determinación de los receptores esteroideos ha permitido clasificar los tumores mamarios, según su contenido receptor, en hormonodependientes (RE+ RP+) y hormonoindependientes (RE- RP-). También existen otros tumores que presentan interpretaciones controvertidas (RE+ RP- y RE- RP+). La mayoría de los tumores mamarios experimentales presentan ambos tipos de receptores y su contenido medio es mayor cuanto menor es la dosis de carcinógeno utilizada ([798], [1678]). En cáncer de mama humano, esta clasificación ha resultado de gran utilidad puesto que permite seleccionar a las pacientes candidatas de terapia hormonal. Además, el contenido en receptores, junto con otros factores pronóstico, ayuda a distinguir las pacientes con mayor riesgo de recurrencia. Al menos un 70% de las pacientes con cáncer de mama son clasificadas como RE+, por lo que el tratamiento más aplicado es el de interferir en la actividad estrogénica ([7062]). Sin embargo, la determinación de los receptores no es suficiente para discernir la hormonodependencia funcional, como lo demuestra el hecho que entre un 20 y un 30% de los tumores con receptores no responden a la terapia endocrina (tumores

hormonoinsensibles). Se han propuesto diferentes causas para esta resistencia al tratamiento antiestrogénico, como la pérdida de la funcionalidad de RE o mutaciones del mismo, alteraciones post-receptor, o producción alterada de factores autocrinos o paracrinos, entre otras ([3405]). La estructura, el patrón de expresión y las funciones de los receptores de estrógenos y progesterona se discutirán con más detalle en el subapartado E.2.

Finalmente, al analizar el papel de los factores endocrinos en el cáncer de mama, debe considerarse el de las hormonas exógenas, y en particular el de los estrógenos. Existe una gran variedad de fuentes externas de estrógenos, también conocidos como xenoestrógenos, los cuales son la clase más numerosa dentro de los disruptores endocrinos ([7681]). Son sustancias químicas, exógenas al organismo, que presentan una actividad hormonal esteroideal (estrogénica) y cuando se ingieren o se absorben tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino. Pueden distinguirse: fitoestrógenos y micoestrógenos, como las isoflavonas, lignanos y coumestanos; compuestos químicos sintéticos, entre los que se encuentran esteroides sintéticos y SERM's ("Selective Estrogen Receptor Modulators") como el tamoxifeno; y contaminantes medioambientales hormonalmente activos, como compuestos clorados (pesticidas, bifenilos policlorados y dioxinas/furanos), alquifenólicos (detergentes, antioxidantes en plásticos, espermicidas, cosméticos y champús) y bisfenol-A y/o derivados (policarbonatos, empastes dentales, resinas acrílicas y fungicidas) ([4653], [4662], [4713], [7678], [7679], [7681]). En general, la estimación del riesgo de padecer cáncer de mama por la exposición a hormonas exógenas es difícil, ya que el período de latencia entre la exposición y la aparición de los síntomas de la enfermedad es largo. La genisteína, un fitoestrógeno presente en la soja, muestra un efecto quimiopreventivo en modelos experimentales con tumores mamarios inducidos químicamente. En humanos, se ha observado una asociación entre el aumento del consumo de soja y la disminución del riesgo de padecer cáncer de mama ([4506]). Los SERM's con actividad antiestrogénica constituyen la principal terapia endocrina utilizada actualmente. Dentro de este grupo, el tamoxifeno es un antagonista no esteroideal que actúa por inhibición competitiva con el estradiol en su unión a órganos diana, pero a muy altas concentraciones posee un efecto estimulador del cáncer de mama ([2363], [3326]). El tamoxifeno reduce la mortalidad y recurrencia del cáncer de mama en el 25 y 50% de los casos, respectivamente, en mujeres receptor de estrógenos positivo (RE+), aunque una tercera parte de éstas no responden a dicho tratamiento ([4505]).

## **2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS.**

La carcinogénesis es un proceso altamente complejo que resulta de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas entre las que se halla la inactivación de genes supresores y la activación de protooncogenes, de forma secuencial y/o simultánea ([2444], [3973], [7688]).

Las proteínas codificadas por los protooncogenes son componentes de las vías fisiológicas de transducción de señales mitogénicas: factores de crecimiento (PDGF $\beta$ / v-sis), receptores de factores de crecimiento (EGFR/v-erbB), proteínas citoplasmáticas transductoras de señales (c-Ha-ras) y factores de transcripción (c-myc, c-fos, c-jun) ([1576], [1881]). Estos genes pueden transformarse en oncogenes mediante un proceso de activación, que supone una ganancia de función en el sentido que las proteínas codificadas quedan permanentemente activadas, lejos de cualquier tipo de control, resultando en una estimulación del crecimiento excesiva o anormal ([1975], [2393], [4202]). En cambio, los genes supresores de tumores inhiben el crecimiento celular, inducen a las células a la diferenciación terminal y/o inducen la muerte celular programada o apoptosis. Por ello, las mutaciones que eliminan las funciones de estos genes facilitan la formación de tumores al liberar a las células de las restricciones normales para proliferar ([2846]). En este sentido, se habla de mutaciones con pérdida de función puesto que inactivan un componente represor de la proliferación celular ([1948]). En general, se requiere una nulicigosidad funcional para desencadenar el sobrecrecimiento celular tumoral. Ello significa que mientras exista una copia normal del gen existe función supresora (heterocigoto para la función) y que, en cambio, la mutación de ambos alelos (simultánea o por pérdida de heterocigosidad) supone la pérdida de dicha función ([2606]). En algunos casos, la identificación de los genes supresores de tumores, como el gen del retinoblastoma (Rb) y el gen p53, ha ido ligada al estudio de los cánceres familiares donde la predisposición a padecer diferentes tipos de neoplasia se hereda como un típico carácter mendeliano autosómico ([2493]).

Las alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de éstos y, probablemente, otros genes implicados en procesos tan esenciales para la célula como la proliferación, la diferenciación o la apoptosis se hallan en la base de los mecanismos moleculares del cáncer. Hanahan y Weinberg en el año 2000 describieron una serie de capacidades esenciales que compartían las células tumorales, y en una revisión posterior añadieron características nuevas de la célula tumoral ([3973], [7349]). En total se han descrito 8 capacidades esenciales: 1) autosuficiencia en cuanto a la necesidad de factores de crecimiento; 2) insensibilidad a factores inhibidores

del crecimiento; 3) evasión de la muerte programada (apoptosis); 4) potencial ilimitado de replicación; 5) evasión del sistema inmune; 6) reprogramación del metabolismo energético tumoral; 7) angiogénesis sostenida; 8) invasión de tejidos y metástasis. Además se ha atribuido dos capacidades facilitadoras de la supervivencia de las células tumorales, como son la inestabilidad genómica y mutación, y la promoción de la inflamación tumoral. La adquisición de todas estas capacidades implica alteraciones de los genes anteriormente mencionados.

La primera de las características mencionadas hace referencia al hecho de que la célula tumoral, en comparación con la célula normal, muestra una reducida dependencia de las señales exógenas estimuladoras del crecimiento. Esta capacidad incluye varios mecanismos, entre los que se encuentran la adquisición de la habilidad de sintetizar factores de crecimiento (como PDGF y TGF $\alpha$ ); la alteración de la expresión y/o activación de receptores de factores de crecimiento, como EGFR y ErbB2; la alteración de algunos de los componentes de las vías de señalización intracelular mitogénica, como la vía Sos-Ras-Raf-ERK1/2 -en el 30% de los tumores humanos, las proteínas Ras se encuentran estructuralmente alteradas, lo que genera un flujo de señales mitogénicas hacia la célula sin necesidad de estimulación de sus reguladores “upstream”-; o la inducción de la síntesis de factores de crecimiento por las células vecinas ([1576], [1881], [5484]). Otra de las particularidades de la célula tumoral es la capacidad de evadirse de las señales antiproliferativas que en un tejido normal mantienen las células quiescentes y la homeostasis tisular. Algunas de estas señales están asociadas con componentes responsables del paso de las células por la fase G1 del ciclo celular, como la proteína Rb fosforilada (pRb), p107 y p130; y con la diferenciación, como el factor de transcripción c-myc, APC/ $\beta$ -Catenina, etc ([3973]). Pero el cáncer no aparece necesariamente como resultado de un aumento de la tasa de proliferación celular, sino que su desarrollo depende del balance crítico entre este proceso y el de apoptosis. Por tanto, la desregulación de la proliferación junto con la reducción de la apoptosis serían los fenómenos responsables de crear un “escenario” que sería necesario y a la vez suficiente para el desarrollo del cáncer ([4061], [5576]).

La adquisición de las capacidades de autonomía, insensibilidad a factores antiproliferativos y resistencia a apoptosis conduce a la célula a un crecimiento independiente del medio. Pero para un crecimiento ilimitado es necesaria la evasión de la senescencia e inmortalización, a través de la incapacitación de las proteínas supresoras de tumores pRb y p53, y el mantenimiento de los telómeros ([3973]). Las mutaciones en el gen p53 representan

uno de los cambios genéticos más comunes identificados en el cáncer de mama. Además, las alteraciones de esta proteína están asociadas con una mayor agresividad de los tumores y con un peor pronóstico ([3144], [4595], [7683]). Por otro lado, la célula tumoral se caracteriza por una tasa de mutabilidad elevada por el aumento de la sensibilidad a agentes mutagénicos o mediante la alteración de los mecanismos reparadores del genoma, confiriendo así inestabilidad genómica. La pérdida del ADN telomérico en los tumores también genera una situación de inestabilidad genómica, en la que se producen amplificaciones y deleciones de segmentos cromosómicos. Los defectos en el mantenimiento del genoma y la reparación confieren ventajas selectivas, y por lo tanto útiles para la progresión tumoral ([7349], [7682]).

La actividad del sistema inmunológico constituye un importante impedimento en la formación y progresión tumoral, reconociendo y eliminando a la mayoría de incipientes células cancerosas o a los tumores emergentes en varios tipos de cáncer ([7684], [7685], [7686]). De acuerdo con esto, los tumores que terminan por aparecer, obviarían la vigilancia por parte del sistema inmunitario o bien evitarían ser eliminados por él de distintas maneras, como sería paralizar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células NK o secretando factores inmunosupresores como el TGFβ ([7693], [7694]). Por otra parte, la inflamación contribuiría a la formación tumoral aportando moléculas bioactivas al microambiente tumoral, por ejemplo factores de crecimiento que mantendrían las señales proliferativas o enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitarían la angiogénesis, la invasión y la metástasis ([7368], [7695], [7696], [7697]).

Análogamente, durante el crecimiento del tumor, éste necesita, además de la proliferación celular, una serie de reajustes del metabolismo para poder abastecer las necesidades energéticas del crecimiento y división celular. Se produce un aumento marcado de la captación y utilización de la glucosa, aumentando la expresión de sus transportadores, principalmente GLUT1 ([7698], [7699], [7700]). De igual manera, el tumor necesita crear vasos sanguíneos (angiogénesis) para recibir oxígeno y nutrientes. Los tumores alteran la transcripción génica favoreciendo la expresión de factores pro-angiogénicos en detrimento de los anti-angiogénicos, por ejemplo incrementando la expresión de VEGF y/o FGFs, o disminuyendo la expresión de inhibidores endógenos como la trombospondina-1 y el interferon-β ([3973], [4722]). Finalmente, los tumores deben adquirir la capacidad de invadir otros tejidos y metastatizar, y para ello deben alterar la expresión/función de moléculas de adhesión célula-célula y célula-substrato, como E-Cadherina, β-Catenina, N-CAM e Integrinas; proteasas de superficie degradadoras de la matriz extracelular, etc ([3973], [4723]).

Tal y como se ha comentado, las alteraciones de todos los tipos de genes mencionados constituyen la base de la transformación neoplásica, permitiendo la adquisición de las

capacidades de la célula tumoral. La acumulación de mutaciones ha sido considerada clásicamente el mecanismo de alteración de estos genes. Sin embargo, este paradigma ha sido extendido para incluir la disrupción epigenética como uno de los mecanismos principales de transformación maligna. La alteración epigenética más estudiada en cáncer en general, y al de mama en particular, son las modificaciones en los patrones de metilación del ADN. La hipometilación global, junto con la hipermetilación de genes específicos, es una característica común de las células tumorales ([7307]). La pérdida global de metilación ha sido asociada con la sobreexpresión de protooncogenes, la predisposición a la inestabilidad cromosómica y la aneuploidía ([7022]). Asimismo, la hipermetilación de promotores de genes está asociada a la inactivación de genes implicados en vías de reparación del ADN, control del ciclo celular o apoptosis. Se han descrito numerosos genes hipermetilados en tumores de mama humanos implicados en la adquisición de las características de la célula tumoral anteriormente comentados ([7310], [7318]). Otros mecanismos epigenéticos están frecuentemente desregulados en diversos tipos de cáncer, tales como cambios aberrantes en la modificación de histonas, expresión desregulada de microARNs o la sobreexpresión de proteínas del grupo “polycomb” que evitan la unión de la maquinaria de transcripción a las secuencias promotoras del ADN ([6609], [7022], [7304]).

Por último, y en lo que respecta al cáncer de mama hereditario, éste constituye únicamente el 5-10% del total de cánceres mamarios ([4534]). Se han descrito diversos genes que están relacionados con la susceptibilidad de un individuo de padecer este tipo de cáncer, señalando BRCA1 -“Breast Cancer 1”- y BRCA2 -“Breast Cancer 2”- como los principalmente implicados ([2522], [2586], [7687]). La mutación de BRCA1 en la línea germinal se ha identificado en el 15-20% de pacientes con historia familiar de cáncer de mama y en el 60-80% con historia familiar de cáncer de mama y ovario. BRCA1 codifica una proteína nuclear que funciona como un coactivador transcripcional. Ésta une a BRCA2, p53, RAD51 y otras proteínas involucradas en el ciclo celular y de respuesta al daño en el ADN. Células sin BRCA1 funcional no se paran en G<sub>2</sub> después de un daño en el ADN y son deficientes en la reparación acoplada a la transcripción. BRCA1 es parte del complejo RAD50-MRE11-p95, componente esencial de la reparación mediada por recombinación de las roturas del ADN de doble cadena ([4534], [4623]). En general, las mutaciones de pérdida de función de BRCA1 confieren un riesgo del 83% de desarrollar cáncer de mama y del 63% de cáncer de ovario antes de los 70 años ([2586], [2845]). Las mutaciones en BRCA2 se caracterizan por su asociación con un elevado riesgo de cáncer mamario en hombres ([2586], [7687]). El hecho de que las mutaciones

en estos dos genes confieran en los hombres grados diferentes de riesgo de padecer cáncer de mama hace pensar en que puedan estar regulados por hormonas sexuales ([2586]). BRCA1 puede interaccionar y actuar como coactivador del promotor del receptor de andrógenos, lo que explicaría porque la variación alélica en el receptor de andrógenos afectaría a la penetrancia del cáncer de mama en portadores de la mutación en BRCA1. BRCA2 estaría involucrada en la respuesta mediada por recombinación de la rotura de doble cadena de ADN y el mantenimiento de la integridad cromosómica, asimismo desempeña un papel en la segregación de los cromosomas ([4534], [4595], [4623]). De todas formas, no todos los casos hereditarios se explican por una alteración en alguno de estos genes, por lo que se cree que en el futuro se aislarán nuevos genes relacionados con esta patología.

### 3. FACTORES AMBIENTALES.

La incidencia del cáncer de mama presenta grandes diferencias geográficas ([3412], [4333], [4647]). La tasa en poblaciones de baja incidencia que viajan a países de gran incidencia varía hasta asemejarse a las de la nueva región en 2-3 generaciones. Ello sugiere que además de los factores genéticos y endocrinos deben existir factores medioambientales y de estilo de vida implicados en el desarrollo del cáncer de mama ([4349], [4350], [4539], [4647]). De todos ellos, los nutricionales se consideran de gran trascendencia debido a la continua exposición a la que se encuentra sometida la población por sus hábitos alimentarios, siendo los lípidos los que han demostrado estar entre los más relevantes. En este sentido, existen numerosos estudios experimentales y epidemiológicos que han puesto de manifiesto dicha relación, aunque algunos resultados, epidemiológicos principalmente, son controvertidos. En el caso de los estudios ecológicos por países, se ha hallado una asociación positiva entre el consumo de grasa *per capita* y las tasas de mortalidad por cáncer de mama, destacando en tales estudios que los países con dieta mediterránea presentan valores intermedios para este cáncer. De la misma manera, los estudios de migración de poblaciones muestran que las poblaciones que migran entre áreas con distintas incidencias de cáncer de mama tras una o dos generaciones adquieren las tasas de mortalidad propias del país de destino. Sin embargo, en los estudios caso-control y los prospectivos de cohortes la relación no es tan manifiesta, habiéndose hallado motivos metodológicos para explicar las discrepancias existentes, entre ellos el bajo número de efectivos de estos últimos estudios en comparación con el de los estudios por países. La agrupación de varios de ellos, mediante técnicas de metanálisis, ha permitido reanalizar los datos con mayor

consistencia y, en algunos casos, la relación entre lípidos de la dieta y cáncer de mama ha quedado manifiesta ([868], [1660], [3840], [7692]). Además, recientemente, el proyecto EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) ha mostrado que la ingesta elevada de grasas, independientemente del tipo, está asociado con elevado riesgo de cáncer de mama ([6321]). Por otra parte, los estudios experimentales han mostrado claramente una asociación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. En este sentido, animales alimentados con dieta con elevada cantidad de grasa presentan mayor incidencia tumoral, más allá de la elevada ingesta calórica y del peso corporal. Asimismo, según se ha descrito, los efectos de los lípidos de la dieta dependerían, no sólo de la cantidad sino también del tipo de grasa, la fase del proceso carcinogénico y del estado de diferenciación de la glándula mamaria ([3338], [5816], [7145]).

En general, las dietas hiperlipídicas son fundamentalmente promotoras del cáncer de mama, aunque dietas con una misma cantidad de energía y contenido graso total difieren en su capacidad estimuladora según su composición en ácidos grasos ([2289], [4540]). Además, parece existir un requerimiento mínimo de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) a partir del cual el efecto de la grasa dependería de la cantidad total de lípidos de la dieta. Concretamente, por encima del 4-5% de PUFA, respecto al total de calorías, el rendimiento de la carcinogénesis por dimetilbenz-( $\alpha$ )antraceno (DMBA) incrementa proporcionalmente a la cantidad de grasa total de la dieta, independientemente de que ésta sea de origen animal o vegetal ([2045], [3568]). En cuanto al efecto de las calorías, se ha demostrado una asociación positiva entre el aporte calórico de las dietas y las tasas de mortalidad por cáncer. Además, la restricción calórica tiene un efecto inhibitorio indiscriminado sobre la carcinogénesis, lo que sugiere un mecanismo de acción inespecífico ([3673]). Por tanto, una parte del efecto estimulador de las dietas ricas en grasas podría ser atribuido a su elevado contenido en calorías, aunque existen mecanismos específicos por los cuales los lípidos de la dieta influyen en el cáncer de mama ([1962]). Un argumento que apoya esta conclusión es el hecho de que sólo ciertos tipos de tumores se estimulan por las dietas ricas en grasas. El diferente efecto de los distintos tipos de lípidos así como los mecanismos por los cuales modulan la carcinogénesis serán ampliamente discutidos en el apartado D de este capítulo.

Aunque otros factores nutricionales han sido relacionados en estudios experimentales con el cáncer de mama, epidemiológicamente los resultados no son totalmente concluyentes ([6093]). Así, se ha sugerido una posible disminución del riesgo de la carcinogénesis mamaria por efecto de proteínas de origen vegetal, fibra, vitaminas (A, C, carotenoides), licopeno,

glucosinolatos e indoles, isoflavonas y lignanos, selenio, o metilxantinas, mientras que algunos trabajos han indicado un aumento del riesgo por efecto de dietas con elevadas cantidades de proteína animal (Caseína) o azúcares simples ([7677]).

Existen datos epidemiológicos que han asociado otros factores ambientales y de estilo de vida, además de los nutricionales, con el riesgo a desarrollar cáncer de mama. La obesidad es considerada un factor de riesgo independiente en mujeres post-menopáusicas, mientras que se ha sugerido que podría disminuir dicho riesgo en mujeres pre-menopáusicas. Estudios caso-control también han sugerido una asociación entre el peso en el momento del nacimiento y el riesgo de cáncer de mama ([6093]). Por otro lado, diferentes estudios observacionales han mostrado una asociación positiva entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de mama ([6093]). En cuanto al consumo de tabaco, éste ha sido claramente asociado con otros tipos de cáncer, pero la relación con el de mama ha mostrado resultados inconsistentes. No obstante, las evidencias apuntan a un aumento del riesgo tras un largo período de hábito tabáquico, inicio antes del primer embarazo a término, y en fumadores pasivos ([7675]). La actividad física, por otra parte, ha mostrado una asociación inversa con el riesgo de cáncer de mama, sobretodo en mujeres post-menopáusicas ([6093]).

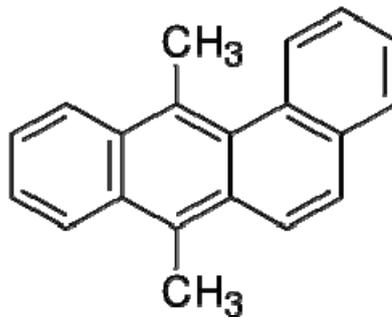
Por último, se ha sugerido que otros factores tales como radiaciones ionizantes, metales como el cadmio, xenoestrógenos y otros disruptores endocrinos (dietilestilbestrol, bisfenol A, parabenos, alquilfenoles, dioxinas, pesticidas), y diversos compuestos químicos (solventes orgánicos, aminas aromáticas, benceno, PVC), podrían estar relacionados con el aumento en la incidencia del cáncer de mama observado en las últimas décadas ([7676]).

### **C. MODELO EXPERIMENTAL.**

Los experimentos *in vivo* son esenciales para el estudio de la patología mamaria. En este trabajo se escogió un modelo que utiliza ratas sobre las que se aplica un carcinógeno químico, el hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno (DMBA) (Figura 5), capaz de provocar la aparición de tumores mamarios de características muy parecidas a las de los tumores humanos ([1438], [4264]). La inducción tumoral se efectuó siguiendo el método de Huggins *et al.* ([439], [443]) modificado ([1299]). Este carcinógeno, administrado por instilación buco-gástrica, presenta una serie de ventajas con relación a otros carcinógenos químicos, entre las que destacan: efectos extratumorales moderados (leucopenia,

alteraciones del crecimiento), siempre y cuando la dosis no sea superior a la descrita (20 mg DMBA/animal); mortalidad post-inducción prácticamente nula; practicabilidad de la técnica; y alto rendimiento en la promoción específica de tumores mamarios con características similares a los humanos.

El DMBA es un compuesto lipófilo que requiere activación metabólica para actuar como carcinógeno ([4537]). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se activan principalmente por las enzimas citocromo P450 pertenecientes a la familia tipo 1 (CYP1). Las formas moleculares intermediarias del proceso de oxidación que catalizan son especies electrofílicas reactivas (los metabolitos carcinogénicos), capaces de interactuar con macromoléculas celulares, particularmente ácidos nucleicos y proteínas ([7701]).



**Figura 5. Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno (DMBA).**

Hasta el momento, se han descrito tres vías principales de metabolización del DMBA: 1) monoxigenación y formación de diol-epóxidos, 2) oxidación por transferencia de un electrón y formación de radicales catiónicos y 3) oxidación dependiente de NADPH y formación de *o*-quinonas. Los complejos formados por la unión directa de los metabolitos generados por estas vías y el ADN, sin que se produzcan cambios estructurales en ninguna de las moléculas, constituyen los denominados aductos. Estos complejos pueden ser estables, y permanecer en el ADN, a menos que puedan ser reparados por los mecanismos de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). Por otra parte, los complejos pueden ser depurinizantes, liberándose del ADN por ruptura del enlace glicosídico entre la base purínica y la desoxiribosa ([4080], [4081]). Si los aductos no son eliminados ni el ADN reparado, estos constituyen lesiones premutagénicas que preceden la iniciación tumoral ([4047]). Los metabolitos reactivos también pueden generar daño oxidativo ([6769]), aspecto que será tratado en el subapartado E.3 de este capítulo.

La primera vía descrita, considerada el mecanismo dominante de metabolización del DMBA, tiene lugar principalmente en la región “bay” de la molécula, a partir de la cual se generan los metabolitos más reactivos, siendo estos los más estudiados ([1425]). Dichos metabolitos son el resultado de una primera epoxidación por la enzima P450, seguida de una hidrólisis catalizada por la epóxido-hidrolasa microsomal, y una segunda epoxidación ([906], [6769]). De todos los isómeros formados, los diol-epóxidos son los que presentan mayor potencia carcinogénica, creando uniones covalentes con el ADN para formar aductos ([2388]). Los metabolitos diol-epóxidos son el *sin*- y el *anti*-7,12-dimetilbenz[ $\alpha$ ]antraceno-3,4-diol-1,2-epóxido (*sin*- y *anti*-DMBADE), ambos con capacidad iniciadora. Estos metabolitos generan principalmente tres tipos de complejos estables con el ADN, mayoritariamente con desoxiadenina y desoxiguanina: *anti*-DMBADE-dG, *sin*-DMBADE-dA, y *anti*-DMBADE-dA. El potencial iniciador de cada uno de ellos es diferente, así como las proporciones en las que son formados dependiendo de las enzimas implicadas ([4048]). Otra de las vías metabólicas del DMBA, también catalizada por las enzimas CYP, consiste en la eliminación de un electrón de la molécula a través de una oxidación ([6769]). El radical catión resultante es un compuesto electrofílico, que forma aductos en el ADN muy inestables, favoreciendo así la depuración espontánea, a diferencia de los aductos estables. En glándula mamaria de rata se han identificado dos tipos de complejos depurinizantes por la unión al ADN de compuestos catiónicos: 7-metilbenz( $\alpha$ )antraceno-12-CH<sub>2</sub>-N7adenina (el 80%) y 7-metilbenz( $\alpha$ )antraceno-12-CH<sub>2</sub>-N7guanina (el 20%). Como consecuencia, se genera un sitio apurínico, que en los siguientes ciclos de replicación celular terminará produciendo una transversión A→T o G→T ([4080]). Finalmente, la tercera vía de activación del DMBA es la oxidación catalizada por la enzima dihidrodiol deshidrogenasa, enzima que compite con CYP por la oxidación del hidrocarburo. Tras una serie de reacciones, oxidación, reorganización y autooxidación, se generan compuestos *o*-quinonas que pueden formar aductos con el ADN o reaccionar con tioles celulares, como el glutatión, dando lugar a conjugados solubles en agua. En este proceso metabólico se consume oxígeno y se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que en presencia de metales, puede convertirse en OH<sup>-</sup> y provocar daño oxidativo en el ADN (véase subapartado E.3). Debido a la generación de ROS, este mecanismo es considerado una vía de activación metabólica más que de detoxificación. Recientemente, se ha propuesto una cuarta vía metabólica de activación que consiste en la esterificación de ácido sulfúrico catalizada por la enzima hepática sulfotransferasa ([6769]). Todas estas vías pueden contribuir a la carcinogénesis inducida por DMBA. La formación de aductos específicos parece ser dependiente de la dosis de carcinógeno, el tiempo de exposición y el método de administración. Actualmente, la vía de los diol-epóxido sigue

considerándose la principal vía de acción del DMBA. A pesar de que éste es un tema controvertido, diversos autores han sugerido que son los sitios apurínicos, causados principalmente por los aductos inestables, los que inducen las transversiones típicamente producidas por el DMBA, ([4048], [4080], [4175], [4176], [4177]).

Los factores críticos del modelo experimental de cáncer de mama inducido con DMBA son: 1) la especie animal receptora, 2) la dosis de carcinógeno y 3) el momento de administración del carcinógeno por instilación gástrica. En cuanto a la especie seleccionada, la rata es el animal que mejor se ajusta a las necesidades del modelo porque: a) a pesar de la distancia de especie, cumple las condiciones mínimas de semejanza para que los resultados de la experimentación animal puedan ser útiles a la hora de abordar el problema en humanos; b) posibilita el ensayo útil y practicable ya que es un animal fácilmente manipulable; c) posee la propiedad de la hormonodependencia de los tumores mamarios, de tanta trascendencia en humanos; d) los tumores desarrollados inducidos con DMBA, son del mismo tipo anatomopatológico que los tumores humanos ([4264]); e) presenta hasta los ocho meses aproximadamente una incidencia de tumores espontáneos muy baja; f) los tumores espontáneos más frecuentes son los de mama, fundamentalmente benignos -fibroadenomas-, siendo los malignos poco frecuentes, bien localizados y moderadamente invasivos ([447]); g) la vida media de la rata es de 30-40 meses, y el tiempo de latencia de la inducción tumoral es breve (20-40 días). En definitiva, la rata Sprague-Dawley (SD, CFE u OFA) es, por sus propiedades, una de las más utilizadas en las investigaciones oncológicas ([446]).

En cuanto a la dosis de carcinógeno, existe una relación estequiométrica entre ésta y los parámetros de la inducción -incidencia, media tumoral, intervalo de aparición, etc.-; y entre ésta y los efectos tóxicos del DMBA. Así, dosis de 20 mg DMBA/animal son las óptimas para ensayar agentes inhibidores, y dosis de 2.5 a 5 mg DMBA/animal para agentes promotores. Más de 20 mg DMBA/animal no mejoran la eficacia del método y, en cambio, aumentan la mortalidad post-inducción y los efectos extratumorales del carcinógeno. La administración oral del carcinógeno mediante instilación gástrica es la más efectiva y cómoda. Utilizando una única dosis los resultados son mejores que con cualquier otro sistema: baja mortalidad debido a los efectos tóxicos del carcinógeno, desarrollo rápido de tumores mayoritariamente mamarios, alta incidencia y alto contenido tumoral ([439]).

El momento en que se realiza la inducción es clave para la producción tumoral. La susceptibilidad de la glándula mamaria de la rata a los carcinógenos químicos depende del estado en que se encuentre el animal en el momento de la administración del carcinógeno. En

general, los estudios que utilizan DMBA realizan la inducción sobre animales hembras de 50-55 días de edad, poco tiempo después de la edad media de la pubertad, cuando se dan una serie de características en el animal que lo hacen más receptivo a los efectos del carcinógeno. Además, esta edad coincide con la época de mayor síntesis de ADN en la glándula mamaria, en relación también con el estado hormonal ([472]). Asimismo, se ha de tener en cuenta el historial reproductivo de los animales, ya que la tasa de proliferación, y consecuentemente la cantidad de DMBA unido a ADN, es diferente según si la glándula mamaria es de una rata nulípara o multípara. Así, las ratas vírgenes o nulíparas tienen una glándula mamaria con alto contenido en TEBs con elevada capacidad proliferativa, con una mayor captación de metabolitos reactivos del DMBA y formación de epóxidos. Además, tienen una menor capacidad para eliminar los aductos ya que la duración de la fase G1 del ciclo celular es menor. En cambio, estructuras más diferenciadas, como las estructuras lobulares, que predominan en la glándula mamaria de los animales gestantes, se caracterizan por tener baja actividad sintética de ADN, bajo índice mitótico, baja captación de carcinógeno, y mayor capacidad para reparar daños en el ADN ([3122], [3503]). El DMBA induce en estos animales la formación de estructuras transformadas que en lugar de diferenciarse normalmente a AB o involucionar a TD, crecen y se agrandan al proliferar las células epiteliales luminales, constituyendo las proliferaciones intraductales (PIDL) ([995], [3966]). Algunas de estas progresarán formando microtumores (carcinomas intraductales) y posteriormente, a carcinomas invasivos, desarrollando varios patrones: cribiforme, tipo comedo o papilar. Algunos TEBs presentes en la glándula mamaria en el momento de la inducción aún se diferencian en AB, pero su número siempre es menor que en animales no inducidos. Aquellos TEBs que ya se habían transformado en estructuras más diferenciadas (AB y estructuras lobulares tempranas) antes de la administración del carcinógeno, no desarrollan carcinomas ([3122]). La observación de que los carcinomas mamarios experimentales surgen de estructuras no diferenciadas (TEB y TD) y que las lesiones benignas, como adenomas, quistes y fibroadenomas, evolucionan de estructuras más diferenciadas, indicaría que el carcinógeno requiere de una diana estructural adecuada y que el tipo de lesión inducida es dependiente del área de la glándula mamaria afectada. Este hecho viene corroborado por la mayor incidencia de tumores localizados en las glándulas de la región torácica, que son las que mayor cantidad de TEBs poseen ([1520], [1524], [3122], [4537]).

#### **D. LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA.**

Numerosos estudios epidemiológicos y, fundamentalmente, experimentales, han puesto de manifiesto la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. De todos los componentes de la dieta que han estado relacionados con el cáncer de mama, los lípidos son los más relevantes. En general, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la familia n-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n-6), presentes en aceites vegetales, son los principales promotores de la carcinogénesis ([1358], [3568], [3672], [4324]). Es de destacar el ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3n-6) que supone una excepción dentro de esta familia, ya que posee propiedades antiproliferativas ([3980], [3982]). Además, el ácido linoleico conjugado (CLA), término en el que se engloban diversos isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, y que está presente en la carne y en los productos lácteos derivados de rumiantes, podría tener un efecto inhibidor del cáncer de mama ([2949], [3205]). Además, éste presenta propiedades antidiabéticas, anticancerígenas y antioxidantes ([4538], [4543]). Por otro lado, los PUFA de la familia n-3, fundamentalmente el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3), y los de cadena larga, de origen marino, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), serían inhibidores del crecimiento tumoral mamario y la metástasis ([1486], [3568], [3615], [4324], [4353]). En cuanto a las grasas saturadas de procedencia animal, y los lípidos insaturados *trans* que se originan tras los procesos de manufacturación de varios productos de aceites vegetales, también son promotoras, pero menos potentes que las grasas polinsaturadas de origen vegetal, y además, podrían actuar como co-carcinógenos durante la iniciación. Así, los lípidos insaturados *trans* se comportarían como los saturados en cuanto a la promoción de la carcinogénesis mamaria ([920], [1486], [3205]). Finalmente, el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados, fundamentalmente el ácido oleico (18:1n-9), presente en elevadas cantidades en el aceite de oliva, es de especial interés. La dieta mediterránea, caracterizada por el elevado consumo de aceite de oliva virgen, que también es rico en componentes bioactivos como antioxidantes, se asocia a una menor incidencia de ciertos cánceres, incluyendo el cáncer de mama, así como de enfermedades cardiovasculares ([4743], [6051]). Experimentalmente, aunque cada vez hay más evidencias de un posible efecto quimiopreventivo del aceite de oliva virgen, existen resultados contradictorios. Así, se ha observado desde un efecto no promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama ([3568], [5321], [7144]). Por lo tanto, la relación entre consumo de aceite de oliva y cáncer de mama constituye un tema controvertido que podría tener importantes repercusiones en la salud humana, especialmente entre la población femenina ([3864]).

Los mecanismos por los cuales los lípidos de la dieta pueden actuar sobre el desarrollo del cáncer de mama no han sido totalmente determinados, pero a partir de los datos experimentales se podrían establecer a varios niveles entre los que se podrían destacar: 1) las etapas de la carcinogénesis, 2) los niveles hormonales, 3) las modificaciones de la membrana celular, 4) la transducción de señales mitogénicas, 5) la expresión génica, 6) la proliferación celular, y 7) el sistema inmunitario. Probablemente, *in vivo*, los lípidos actúen a través de todos estos mecanismos de una forma integrada, simultánea y/o secuencial.

### **1. INFLUENCIA SOBRE LAS ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS.**

La influencia de los lípidos sobre la carcinogénesis mamaria parece ejercerse fundamentalmente durante la etapa de promoción. Sin embargo, también existen evidencias de su posible papel durante la iniciación de la carcinogénesis, actuando básicamente como cocarcinógenos al facilitar la acción genotóxica de diversos agentes. Así, los lípidos podrían alterar la estructura de la cromatina y afectar la accesibilidad de carcinógenos, la reparación del ADN y/o el acceso de la maquinaria de transcripción a determinados genes ([1937]). En este sentido, estudios *in vitro* sugieren que las interacciones electrostáticas entre histonas y ADN pueden verse afectadas por interacciones con membranas que contienen fosfolípidos ácidos y esfingosina ([2572]). Además, la presencia de fosfolípidos, fundamentalmente esfingomielina y fosfatidilserina, plasmalógenos y colesterol, como componentes de la cromatina está actualmente bien documentada, y algunos estudios sugieren que estos lípidos nucleares podrían jugar papeles importantes en la regulación transcripcional que refleja el estado metabólico o de desarrollo de la célula ([4861]). Por otro lado, en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida con 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina (PhIP) en rata, se ha observado un aumento de los aductos carcinógeno-ADN en las células epiteliales mamarias de los animales alimentados con dieta hiperlipídica n-6 ([3581]). Además, la administración de diferentes tipos de dieta en las etapas previas a la hepatocarcinogénesis inducida con azoximetano en rata también sugiere un efecto sobre la iniciación de los PUFA n-6, pero no de los lípidos saturados ([4178]). En cambio, la exposición de CLA durante el período de maduración de la glándula mamaria en rata se ha demostrado que proporciona un efecto protector en la iniciación de la carcinogénesis ([3195]).

Otro aspecto a considerar es la posible acción carcinogénica iniciadora de las sustancias acompañantes, como contaminantes alimentarios, aditivos y hormonas o bien la

posibilidad de que los lípidos pudieran activar determinadas sustancias exógenas carcinogénicas o modular la producción endógena de sustancias capaces de dañar el ADN ([860], [943], [1029]). Asimismo, determinados metabolitos resultantes de la peroxidación lipídica de los PUFA podrían ejercer dicha acción iniciadora actuando sobre la proliferación de las células tumorales mamarias ([1093], [6614]). Esta última posibilidad será ampliamente discutida en el subapartado E.3 de este capítulo.

## **2. INFLUENCIA SOBRE LOS NIVELES HORMONALES.**

Los estrógenos son las hormonas que podrían estar más directamente implicadas en la acción de los lípidos de la dieta sobre el cáncer de mama, ya que participan en todos los procesos, normales y patológicos de la glándula mamaria. En este sentido, participan, por un lado, en la iniciación del cáncer de mama debido a los efectos genotóxicos de sus metabolitos, y por otro lado, ejercen efectos como cocarcinógenos y en la promoción de la carcinogénesis mediante la estimulación de la proliferación y el crecimiento celular ([7158]).

Los lípidos de la dieta podrían estar implicados en la modificación de la disponibilidad de los estrógenos y por lo tanto, estarían influenciando en el desarrollo del cáncer de mama ya que es una patología hormonodependiente. Así, la alteración del metabolismo de los estrógenos es un posible mecanismo a través del cual los lípidos de la dieta podrían modificar el proceso carcinogénico mamario. Así, una ingesta elevada de grasas puede aumentar el tejido adiposo corporal y mamario, y consecuentemente, también aumentaría la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos a través de la enzima citocromo P450 aromatasa. Esta enzima ha sido hallada en tejido mamario adiposo y tumoral ([824], [7689]). Este hecho se asocia con la observación de que las mayores tasas de cáncer de mama se dan en mujeres post-menopáusicas y obesas ([5367], [5368]).

Por otro lado, se ha descrito que los PUFA n-6 pueden aumentar la estrogenicidad a tres niveles: 1) por desplazamiento de los estrógenos de su proteína transportadora, incrementando los niveles de hormona libre; 2) aumentando la afinidad por su receptor; y 3) inhibiendo la actividad de la enzima 17 $\beta$ -deshidrogenasa e impidiendo de esta forma, el paso de estradiol a estrona ([976], [3421], [3568]). Además, un incremento en el consumo de EPA, a través de la ingesta de pescado, disminuye la formación de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), un metabolito del ácido araquidónico que estimula la actividad de la aromatasa P450, lo cual

disminuiría la producción local de estrógenos y el crecimiento estimulado por éstos ([4546]). Asimismo, el aumento de la ingesta de grasas causa un incremento de la secreción biliar, cuyos ácidos biliares y derivados del colesterol pueden ser transformados a estrógenos por ciertas bacterias de la flora intestinal ([1666]). En este sentido, la actividad moduladora de la biosíntesis de ácidos biliares característica del escualeno, presente en el aceite de oliva virgen, podría explicar, al menos en parte, el efecto protector de este aceite en la carcinogénesis ([3619]). Por otro lado, los lignanos, otros componentes minoritarios del aceite de oliva, presentarían efectos antiestrogénicos debido a su semejanza estructural con el estradiol y el antiestrógeno sintético tamoxifeno. Además, los lignanos inhiben la proliferación inducida por estradiol de células de cáncer mamario humano MCF-7, y estimulan la síntesis de la globulina transportadora de hormonas sexuales, con el subsecuente incremento del estradiol total. Sin embargo, los niveles de estradiol libre se reequilibran para mantener la homeostasis ([4743]). A pesar de las relaciones sugeridas anteriormente, no se han encontrado diferencias claras en los niveles de esteroides gonadales por efecto de las dietas hiperlipídicas ([918], [934], [1046], [1678], [2265]). Los trabajos que sugieren una relación con los receptores hormonales se describen en el subapartado E.2 de este capítulo.

Otro aspecto a tener en cuenta en la posible relación entre los lípidos de la dieta y los estrógenos en cáncer es el hecho de que el ciclo redox del metabolito catecol estrógeno 4-hidroxiestradiol catalizado por enzimas CYP da lugar a radicales libres que pueden dañar el ADN y podrían provocar la peroxidación lipídica de los ácidos grasos ([3568]).

Por otra parte, algunos estudios también han relacionado otras hormonas, como la prolactina, insulina, tiroxina, hormona del crecimiento y corticosterona, con los lípidos de la dieta y el cáncer de mama, aunque los resultados obtenidos son controvertidos ([934], [1077], [1560]).

### **3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR.**

La composición en lípidos polares (fosfolípidos, esfingomielina y cardiolipina en mitocondria) y el contenido en colesterol de las membranas celulares están finamente regulados por las células, y pueden variar en función de los lípidos que habitualmente se ingieren ([1047], [1518], [2264], [3185]). Las membranas celulares parecen mantener relativamente constante sus niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados dentro de un amplio rango de variación en la dieta de estos ácidos grasos. La composición de la

membrana es más sensible a los niveles de PUFA n-6 y n-3 de la dieta, y especialmente a los PUFA n-3 y a la ratio n-3/n-6 ([4818], [6338]). Los cambios en el perfil lipídico de las membranas celulares debidos al consumo de un tipo concreto de grasa pueden modificar el comportamiento celular mediante la influencia en la fluidez de la membrana, las vías de transducción de señales y el grado de peroxidación lipídica en dichas membranas ([4541]). Elevadas cantidades de PUFA n-6 en las membranas se han asociado a una mayor tasa de proliferación celular ([1355], [4324]).

Los cambios en la fluidez de membrana, como el aumento debido a un incremento en la cantidad de PUFA, pueden afectar a la movilidad lateral de proteínas específicas integrales y unidas a membrana, su conformación y su interacción con otros de sus componentes, que podrían producir cambios funcionales ([2264], [2276]). En este sentido, se ha descrito que las dietas ricas en distintos ácidos grasos modifican la densidad y/o conformación de los canales de sodio ([1518]). También se ha descrito que un incremento del contenido de ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de membrana modifica la actividad de la adenilato ciclasa, de la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente y del receptor de insulina ([1347], [1383], [1560], [2264]). En todos estos casos, los PUFA parecen mostrar un mayor efecto que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) ([4818], [4822]). Además, lípidos específicos de membrana regulan la función de proteínas anfitrópicas a las que se unen débil y reversiblemente mediante interacciones covalentes o no covalentes ([2612]). Las interacciones con lípidos de membrana pueden afectar a su ensamblaje, plegamiento u organización topológica y, por lo tanto, su función. Proteínas implicadas en la transducción de señales generadas en las membranas, como las GTPasas Ras, fosfolina citidiltransferasa, PKC y PLC, son comúnmente reguladas por anfotropismo ([4804]). Además, varias proteínas de la matriz extracelular y del citoesqueleto, como vinculina,  $\alpha$ -actinina, profilina y gelsolina, pueden interactuar con fosfolípidos de membrana, regulando procesos fundamentales como la división, migración, adhesión celular, cambio de forma o interacciones célula-célula ([2613], [2614]).

Por otro lado, se ha sugerido un papel de los lípidos de la dieta en la organización de los microdominios de la membrana plasmática, en concreto los conocidos como balsas lipídicas o “lipid rafts”, y en especial las caveolas ([5449], [5451], [6336]). Las balsas lipídicas son dominios pequeños (10-200 nm) y representan el 10-15% del área de la membrana plasmática ([4914]). Se caracterizan por su composición lipídica rica en colesterol, esfingolípidos y lípidos que contienen cadenas de ácidos grasos saturados ([6339], [7249]). Existen al menos dos variedades morfológicamente distinguibles de *lipid raft* en la superficie

celular: las caveolas y los *flat raft* o dominios G. Las caveolas son invaginaciones de membrana con forma de matraz de 50-100 nm y están enriquecidas con la proteína Caveolina ([4914], [5447], [5449]). Tales microdominios están implicados en procesos como transducción de señales, endocitosis, transcitosis, tráfico de colesterol, adhesión y señalización celular ([4541], [4547], [4615], [4914], [5447], [5449], [5451]), lo que explica su implicación en diversos tipos de patologías, entre ellas el cáncer ([4744], [6290]). La función de los *lipid rafts* en la transducción de señales podría ser la de concentrar los receptores para que éstos interactúen con sus ligandos y efectores de ambos lados de la membrana ([4216]). En este sentido, se ha descrito la localización de algunos de los componentes de la vía de señalización intracelular mediada por la proteína Ras, incluyendo la propia p21Ras, en estos microdominios de membrana ([4198], [5465], [5481]). En colon de ratones, se ha observado una disminución de la activación de la proteína Ha-ras por efecto de los lípidos n-3 de la dieta, en comparación con los lípidos n-6, asociada con cambios en la composición lipídica y proteica de las caveolas ([4614]). Asimismo se ha descrito un desplazamiento de Ha-ras por efecto de dichos lípidos, y como consecuencia, la supresión de la vía de señalización de Ras, así como una disminución del contenido de esfingolípidos en los *lipid raft* ([6339]).

Por otra parte, existen evidencias de que la composición de fosfolípidos de la membrana nuclear interviene en la regulación de la funcionalidad de ésta y, en consecuencia, de procesos como la replicación y la transcripción del ADN o el transporte núcleo-citoplasmático del ARN ([2264], [4816]).

Finalmente, los lípidos también podrían influir en la carcinogénesis modulando procesos de comunicación celular. En este sentido, se ha descrito en un modelo de cáncer de mama en rata que ácidos grasos PUFA n-6 son capaces de bloquear la comunicación intercelular mediada por uniones tipo *gap junction*, a través de las cuales las células intercambian iones y moléculas de bajo peso molecular en un proceso de cooperación metabólica. Dicho bloqueo resulta en la no transferencia de señales inhibitorias entre células tumorales, lo que conduce a una proliferación descontrolada de las células iniciadas y a la promoción del desarrollo tumoral ([927], [1489], [4824]).

#### 4. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

Los lípidos de membrana, por la acción de varias fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD) activadas por complejos agonista-receptor, pueden generar gran cantidad de moléculas bioactivas que actúan como segundos mensajeros o como moduladores dentro de la cascada de señalización intracelular ([2789], [4541]). Entre ellas, inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (“free fatty acids”, FFA) que activan la proteína quinasa C (PKC), y ácido fosfatídico (PA) que, además, puede ser metabolizado a DAG. Asimismo, PA actuaría, como coactivador de la vía de MAPK junto con p21Ras ([2260], [2430], [3695], [3701]). Por lo tanto, los cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana que se puedan producir por modificaciones en la cantidad o el tipo de lípidos de la dieta, afectarán a la producción y composición de los segundos mensajeros, alterando la expresión génica y la función celular ([3947]). Se ha comprobado que algunas dietas hiperlipídicas incrementan el nivel de DAG y la cantidad de PKC asociada a la membrana ([1942], [2054]). Además, los FFA modifican las actividades de las fosfolipasas, PKC y otras quinasas, proteínas G, ciclasas, así como canales iónicos y la movilización del calcio ([2137], [2264], [2276], [2430], [2556]). Por el contrario, el ácido araquidónico inhibe algunas quinasas ([2137]). También se ha descrito que los PUFA oxidados inhiben tirosina fosfatasa (PTPasas), y por tanto incrementarían en general la fosforilación de tirosinas de las proteínas celulares. En trabajos *in vitro* se ha comprobado que determinados metabolitos del ácido linoleico pueden inhibir la defosforilación del EGFR, aumentando así la cascada de señalización intracelular ([3535], [3824], [5612]), aunque resultados obtenidos por el grupo investigador no muestran modificación de la activación de EGFR por los lípidos de la dieta, en los adenocarcinomas mamarios experimentales ([6879]).

Los lípidos de la dieta pueden afectar la actividad de las proteínas Ras, reguladores críticos de la función celular, como el crecimiento, diferenciación y apoptosis, aunque los mecanismos no son aún conocidos. En este sentido, en el modelo de cáncer de colon inducido con azoximetano, una dieta rica en aceite marino disminuía el contenido de Ras unido a membrana, mientras que una dieta rica en aceite de maíz aumentaba dicha localización sin alterar la farnesilación ni la palmitoilación de la proteína ([3355]). Otros autores han demostrado que los PUFA n-3, en comparación con los PUFA n-6, disminuyen la relación Ras membrana-citosol ([2955]). Referente al aceite de oliva, los compuestos minoritarios como el hidroxitirosol o el escualeno, pueden influir en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles intermediarios lipídicos requeridos para la prenilación de Ras,

necesaria para su activación en la membrana ([3229], ([3619], [3620], [3771], [5767])). En este sentido, el grupo investigador ha demostrado que las dietas ricas en aceite virgen de oliva regulan la activación de Ras disminuyéndola, pero no su localización celular. Asimismo, también se produce la regulación de las distintas vías de señalización que se generan a partir de Ras, favoreciendo la apoptosis en detrimento de la proliferación celular. ([6879]).

Por otra parte, a partir de los fosfolípidos de membrana se producen FFA precursores de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos). Existen dos familias de eicosanoides: los derivados del ácido linoleico (n-6), vía ácido araquidónico, y los derivados del ácido linolénico (n-3), vía EPA ([3185]), que muestran diferentes efectos, en algunos casos, contrarios ([2050]). PGE<sub>2</sub>, producto del ácido araquidónico, promovería la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular, y potenciaría la progresión tumoral, promocionando la angiogénesis del tumor y las metástasis ([4324], [4546]). En este sentido, el efecto promotor tumoral de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama se ha correlacionado con una mayor producción de prostaglandinas ([1107]). Los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas bloquean parcialmente el efecto promotor de las dietas hiperlipídicas ricas en PUFA n-6 en la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA ([2245], [2265]). En relación a los lípidos n-3, CLA y ácido oleico, se ha postulado que su efecto protector se basaría en la utilización de las mismas enzimas de la síntesis de prostaglandinas que los n-6. Este hecho induciría un cambio en las proporciones del tipo de eicosanoides sintetizados ([2245], [3185], [3198], [3564], [3567], [3568], [3569], [4546]). Además, en el aceite de oliva, los compuestos minoritarios como el hidroxitirosol o el escualeno, también pueden influir en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles intermediarios lipídicos, que en el caso del escualeno se produciría una disminución de la prenilación de Ras, necesario para su activación ([3229], ([3619], [3620], [3771], [5767])).

## **5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.**

Numerosos trabajos han descrito que diferentes componentes de la dieta (PUFA, colesterol, glucosa/fructosa, determinados minerales y vitaminas liposolubles) pueden modular específicamente la transcripción génica, el procesamiento y la estabilidad de los transcritos de genes implicados en diversas vías del metabolismo (glucólisis, lipogénesis, etc) ([2415], [2542], [4540]).

Se ha descrito que los lípidos podrían ejercer una influencia en la expresión de genes de dos modos diferentes: un control directo, rápido y agudo de los niveles de expresión, y una modulación adaptativa a largo plazo de la composición de la membrana celular que podría modificar la señalización intracelular ([2415], [4540]).

La modulación de la expresión génica por parte de los PUFA está bien caracterizada en el caso de los genes implicados en la lipogénesis hepática ([2545], [2547], [3929]). Así, los PUFA n-3 y n-6 inhiben la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados no tienen este efecto ([2422], [2549], [2617]). Esta acción de los PUFA depende de una serie de condiciones: un contenido mínimo de 18 carbonos; un mínimo de 2 dobles enlaces localizados en las posiciones 9 y 12, uno de los cuales puede estar en configuración *trans*; y sufrir desaturación por la  $\Delta 6$ -desaturasa ([2542]). También se ha constatado que los PUFA inducen la expresión de genes implicados en la oxidación lipídica y la termogénesis ([3844]).

Por otro lado, hay cada vez más evidencias de que los lípidos pueden regular la expresión de genes implicados en otros muchos procesos, además del metabolismo lipídico. Así, trabajos *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares humanas de cáncer de mama tratadas con ácidos grasos PUFA n-3 mostraron cambios en la expresión de genes implicados en apoptosis, señalización intercelular, comunicación celular, metabolismo o interacción con patógenos. Por el contrario, tal efecto no fue observado en el caso de los PUFA n-6 ([7154]). Por otra parte, la administración de ácido linoleico a células tumorales mamarias, indujo cambios en la expresión del receptor de estrógenos  $\alpha$ , la proteína G G13a, la p38 MAPK, así como de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la transcripción del ARN ([4542]).

El posible efecto de los lípidos de la dieta en la expresión de genes relevantes en la transformación neoplásica será tratado ampliamente en el subapartado E.4 de este capítulo.

## **6. INFLUENCIA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.**

A pesar de que existen algunas discrepancias sobre el efecto *in vivo* de las dietas ricas en grasas sobre la proliferación celular, hay claras evidencias de esta acción *in vitro* ([921], [1355]). Así, se ha podido constatar que los ácidos grasos insaturados reducen significativamente el tiempo de duplicación de las células mamarias normales y tumorales en cultivo, provocando un aumento

de la actividad mitótica celular ([918]). Tal y como se ha comentado anteriormente, se ha descrito una regulación por ácidos grasos insaturados de la expresión de genes implicados en el ciclo celular, como por ejemplo p53 y c-fos ([2227], [2272]), lo que podría estar modulando la tasa de reparación del ADN. Otros estudios sugieren que el incremento en la proliferación y en el número de células en fase S del ciclo celular producido por un tratamiento con ácido linoleico resultaría de la modulación de las distintas vías MAPK existentes en la célula ([4542]). Algunos autores han demostrado que los ácidos grasos de la familia n-6 reducirían la duración del ciclo celular, mientras que los de la familia n-3 inhibirían el crecimiento tumoral mamario ([3012], [3114], [3185], [3581], [4542]). En relación a los ácidos grasos monoinsaturados n-9, trabajos en líneas celulares de cáncer de mama han descrito una inhibición del crecimiento a elevadas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones (<1 µg/ml) se observa un efecto estimulador ([3569]). Asimismo, también se ha planteado la posibilidad de una interacción más o menos directa de determinados lípidos de la membrana nuclear con la maquinaria genética de replicación, transcripción y reparación del ADN ([2571], [2572]).

## **7. EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.**

Los lípidos de la dieta son capaces de modular la respuesta inmune y la producción de citoquinas inflamatorias. Asimismo existe una asociación entre el proceso inflamatorio y el desarrollo tumoral ([7086]), la cual está reconocida como una característica importante del desarrollo del cáncer ([7349]). Los procesos de la inflamación están implicados en la tumorigénesis y en la progresión metastásica incluso en tipos de cáncer cuya etiología no incluye una inflamación pre-existente o una infección, como suele ser el caso del cáncer de mama ([7368]). La activación de dichos mecanismos desencadena la estimulación de factores de transcripción en las células tumorales, siendo el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y el factor nuclear kappa B (NFκB) de los más relevantes. Estos factores coordinan la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas y quimioquinas, facilitando con ello el reclutamiento y la activación de células mieloides (macrófagos, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos). Las citoquinas y factores solubles producidos, activan estos mismos factores de transcripción en células inflamatorias, estromales y tumorales, resultando en la producción aumentada de mediadores de la inflamación y la generación de un microambiente inflamatorio asociado ([7086]).

En cuanto al efecto de los lípidos de la dieta en los procesos inflamatorios, en general, los PUFA n-6 generan eicosanoides con efectos proinflamatorios, mientras que los PUFA n-3 son precursores de eicosanoides con efectos antiinflamatorios ([4546], [4547]). Por lo tanto, las dietas con una proporción de PUFA n-6:n-3 alta probablemente incrementan la generación de eicosanoides inflamatorios, mientras que dietas con una proporción baja de n-6:n-3 decrecerán su producción ([4541]). Es probable que las prostaglandinas estén implicadas en el efecto inmunosupresor de los lípidos ([921]). Por ejemplo, la PGE2 inhibe a macrófagos, células T y B, y estimula las células inmunosupresoras ([2085], [4155], [4547]), además de inhibir la producción de algunas citoquinas, como interleucina (IL) 2 o interferón- $\gamma$ , y de estimular la de otras, como IL-4, IL-5 y IL-10. Por otro lado, se ha observado una inhibición de la proliferación de linfocitos *in vitro*, una disminución en la secreción de TNF (“Tumor Necrosis Factor”), IL1, IL2 e IL6 y una inhibición de la actividad de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos por efecto del ácido araquidónico y los PUFA n-3 ([4547]). Algunos receptores nucleares podrían ser los candidatos a mediar estos efectos sobre el sistema inmune. Así, la activación de PPARs por los ácidos grasos suprime la expresión de citoquinas y otras moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria ([4155]).

Los estudios sobre los efectos del aceite de oliva en el sistema inmune son escasos, pero los datos disponibles indican que éste podría ser un potente mediador de la respuesta inmune y que podría modificar la producción inflamatoria de citoquinas. La atenuación de estos procesos que provoca el aceite de oliva podría explicar los efectos beneficiosos sobre el riesgo del cáncer ([4300]). Se ha demostrado que el ácido oleico tiene efectos anti-inflamatorios ([4992]). Además, algunos fenoles del aceite de oliva virgen extra pueden inhibir la producción de eicosanoides y citoquinas inflamatorios *in vitro* e *in vivo* ([4765], [4972], [6526]). En ratas se ha observado que la ingesta materna de una dieta con 15% de aceite de oliva tiene un efecto inhibidor del cáncer de colon en la descendencia, predominantemente aumentando el número total de células linfáticas y de linfocitos CD8 (+) en los tumores ([4837]). Por el contrario, el consumo de una dieta rica en ácido oleico por humanos sanos no parece dar lugar a una supresión general de las funciones de las células del sistema inmune ([4994]).

## **E. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA CARCINOGENÉISIS MAMARIA.**

### **1. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL.**

Diversas evidencias epidemiológicas sugieren que determinados aspectos de la fertilidad y la maduración sexual se encuentran entre los factores de riesgo del cáncer de mama. La nuliparidad (no tener descendencia) o que el primer embarazo se produzca a una edad avanzada, constituirían unos de estos factores de riesgo, debido a que la glándula mamaria no alcanzaría su máxima diferenciación, o bien la alcanzaría muy tarde. En ambos casos, la glándula mostraría un elevado número de células con elevada susceptibilidad al efecto de los carcinógenos por su estado de indiferenciación. Asimismo, se considera el avance de la pubertad (menarquia precoz) y la menopausia tardía son considerados también factores de riesgo, ya que se aumenta el número total de ciclos reproductivos en los que la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución, lo cual influye en la susceptibilidad a la carcinogénesis de dicha glándula. Por otra parte, al producirse la menarquia precozmente, se induce una proliferación temprana de las células mamarias por la exposición a elevados niveles hormonales ([5975], [6093], [6828], [7616], [7627]).

La pubertad es un proceso largo y complejo en el que se producen una serie de acontecimientos, entre ellos el desarrollo de la glándula mamaria, los genitales, las características sexuales secundarias y la capacidad reproductora. Todo ello forma parte de la maduración sexual del individuo. La pubertad está influenciada por las hormonas, los factores nutricionales y el balance energético. Alteraciones en el balance de todos estos factores durante el desarrollo puede originar efectos adversos en el inicio y progresión de la pubertad ([7620]). En ratas, el desarrollo puberal empieza poco después del destete, y en hembras, clínicamente se considera la apertura vaginal el indicador del inicio de la pubertad. Dicha apertura, así como el proceso de ovulación, se originan en el momento que el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal es completamente maduro ([7628]). La hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) es la responsable a nivel hipotálamico de dicho eje. Las neuronas secretoras de esta hormona (neuronas GnRH) están localizadas en el área preóptica hipotalámica y están sometidas a una intensa regulación por parte de reguladores hipotalámicos, debido a que la secreción de GnRH debe ser la adecuada para el mantenimiento y buen funcionamiento de la función reproductora ([7629], [7630], [7631], [7632], [7633]). Las etapas iniciales de la maduración sexual están mediadas por la aceleración de la secreción pulsátil de GnRH, alcanzando el nivel máximo en el inicio de la

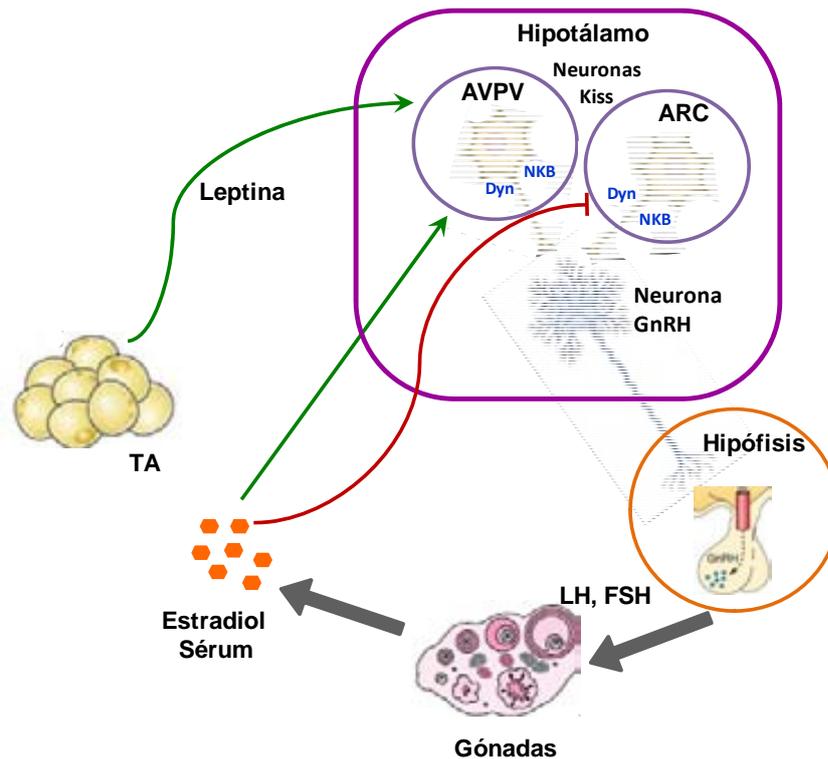
pubertad ([7634]). Los cambios en el patrón de secreción de GnRH durante la pubertad son el resultado de una serie de modificaciones en la señalización sobre la red neuronal de GnRH. Entre los reguladores hipotalámicos identificados, se encuentran glutamato y norepinefrina, como señales excitadoras, y GABA y opioides endógenos, como señales inhibitoras. La generación de la secreción pulsátil de GnRH es producto del equilibrio dinámico entre las señales excitadoras y las inhibitoras, así la activación del eje gonadotrópico será el resultado del aumento de las señales excitadoras en frente la disminución de las inhibitoras ([5907], [7633], [7637], [7653]).

Por otro lado, las neuronas GnRH están sometidas al control del neuropeptido Kisspeptina, el cual es el principal regulador de la secreción de GnRH, así como de otros aspectos de la reproducción. Esta familia de neuropéptidos está codificada por el gen *Kiss1* y actúan a través de su unión, y consiguiente activación, del receptor acoplado a proteína G GPR54 ([6242], [7636]). Inicialmente, estos neuropéptidos fueron descritos como supresores metastásicos debido a la sobreexpresión del ARNm de *Kiss1* en células tumorales con bajo índice de invasividad ([6238]). Posteriormente, se caracterizaron distintas isoformas, siendo la Kisspeptina-54 el producto mayoritario del gen *Kiss1* ([6242]). Su implicación en la maduración sexual se puso de manifiesto tras descubrir la presencia de deleciones y mutaciones inactivadoras del gen de GPR54 en pacientes que sufrían hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático. Esta enfermedad confería una defectuosa secreción de hormonas gonadotrópicas así como infertilidad ([6105], [6226]). La Kisspeptina y su receptor son claves en diversos aspectos de la maduración y funcionamiento de la reproducción, desde la diferenciación sexual del cerebro y el inicio de la pubertad, hasta la regulación, ya en edad adulta, de la secreción de gonadotropinas y el control metabólico de la fertilidad ([7619]).

Las Kisspeptinas se producen y secretan principalmente en grupos neuronales (neuronas kiss) de núcleos hipotalámicos, y de entre estos, de forma mayoritaria en las neuronas del núcleo arcuato (ARC) y el anteroventral paraventricular (AVPV). Estas dos poblaciones neuronales presentan diferencias funcionales, en el caso del núcleo ARC, ejercerían un control negativo sobre el eje gonadotrópico, mientras que las neuronas del AVPV lo estimularían ([5869], [5900], [7640], [7641], [7648], [7649]). Las Kisspeptinas ejercen el control del inicio de la pubertad a partir de una serie de acciones (Figura 6). En primer lugar se produce un aumento de la expresión de kisspeptina, para activar el eje gonadotrópico, y es un requerimiento para el inicio de la pubertad. Asimismo se debe producir un aumento de la sensibilización de las neuronas GnRH a los efectos de la

Kisspeptina. Dicha sensibilización es consecuencia del aumento de la expresión del receptor GPR54 ([7635]). Se ha descrito un aumento gradual del número de neuronas GnRH que expresan el receptor de Kisspeptina entre el período infantil y el prepuberal ([7619]). Finalmente, se produce un incremento de neuronas kiss, así como un aumento de la expresión de Kisspeptina y GPR54, principalmente en el núcleo hipotalámico AVPV y de forma menos importante en el ARC ([5830], [7639], [7641], [7642], [7650]). Por otra parte, las neuronas kiss emiten proyecciones neuronales sobre las neuronas GnRH regulando así la secreción de la hormona gonadotropa. Así, se observa un incremento del número de proyecciones, también de forma más importante en las neuronas kiss del núcleo AVPV, el cual depende del efecto estimulador que ejercen los estrógenos en dichas neuronas, tal y como sugieren estudios realizados en ratones hembras ovariectomizadas o como los de un modelo *knockout* de la enzima aromatasa, involucrada en la síntesis de los esteroides ([7639], [7642], [7652]). Se ha descrito que los esteroides sexuales ejercen distintos efectos en las poblaciones neuronales kiss de los núcleos hipotalámicos AVPV y ARC. Así, los esteroides sexuales ejercen una regulación negativa (*feedback* negativo) a través de  $RE\alpha$  sobre las neuronas kiss del núcleo ARC, las cuales transmiten la información a las neuronas GnRH ([5828], [7645], [7646], [7648], [7649]). Por otro lado, los esteroides realizarían a través de las neuronas kiss de AVPV un *feedback* positivo, el cual es de gran relevancia para la generación del aumento de LH previo a la ovulación ([5869], [7619]).

El control del inicio de la pubertad y la función reproductora en la edad adulta es un proceso complejo que aún no ha sido completamente elucidado. Recientemente se ha descrito que las neuronas kiss del núcleo hipotalámico ARC también expresan Neuroquinina B (NKB) y su receptor NK3R, así como Dinorfina (Dyn), los cuales también estarían regulando de forma precisa la secreción pulsátil de GnRH ([7644], [7646], [7651]). La importancia de la coexpresión de estos neuropéptido junto con la Kisspeptina en la regulación de las neuronas GnRH aún está por determinar, ya que existen datos contradictorios en la literatura ([7638], [7643], [7646], [7647], [7619]).



**Figura 6. Esquema de la neurobiología del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.** TA: tejido adiposo; AVPV: núcleo hipotalámico anteroventral paraventricular; ARC: núcleo hipotalámico arcuato; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculoestimulante; Dyn: Dinorfina; NKB: Neuroquinina B.

La reproducción es una función altamente sensible al estado de las reservas energéticas y el estado metabólico del organismo. Para que esta función se lleve a cabo, se requiere un depósito de energía suficiente y un estado metabólico adecuado. Por lo tanto, las alteraciones en la homeostasis metabólica afectan al eje gonadotrópico y a la expresión de Kisspeptina en el hipotálamo ([5869]). Asimismo, se ha descrito que es necesario llegar a un determinado peso y un cierto grado de tejido adiposo para que se inicie la pubertad ([5423], [5795], [5797]) por lo que los factores nutricionales pueden influir en el momento del inicio. De hecho, el tejido adiposo es dinámico y está en constante comunicación con otros tejidos relevantes, incluyendo a hígado, músculo y los centros reguladores de la ingesta del cerebro ([7624]). Es además, el principal lugar de producción periférica de estrógenos, mediante la conversión de los andrógenos por la acción de la enzima aromatasa, y al mismo tiempo secreta una serie de péptidos, las adipoquinas, las cuales realizarán funciones endocrinas relacionadas con el metabolismo y la reproducción ([6596]). Entre las adipoquinas secretadas se encuentra la Adiponectina, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y la propia Leptina, tal y como ya se ha comentado anteriormente ([7542], [7655], [7656]). La expresión

del gen de la Leptina y su secreción, están reguladas, entre otros factores, por las hormonas esteroideas ([6661], [6966]). Así se ha correlacionado los niveles de estradiol en plasma con la cantidad de grasa corporal y los niveles circulantes de Leptina ([6683]).

Así, existe una compleja red de señales reguladoras que relacionan el metabolismo y la reproducción, de manera que la secreción de GnRH está influenciada por señales metabólicas, entre las que destacan Leptina y Adiponectina ([7619]). La hormona Leptina, codificada por el gen Ob, es producida principalmente en tejido adiposo, aunque también es sintetizada en células epiteliales de la glándula mamaria, ovarios, estómago y placenta entre otros ([7542], [7622]). Uno de los factores que influyen la concentración plasmática de Leptina es la cantidad de tejido adiposo, así los niveles circulantes de Leptina se correlacionan positivamente con el peso corporal y la cantidad de grasa ([7657], [7658]). Asimismo, se ha descrito una correlación entre la cantidad de tejido adiposo y el ARNm de Leptina en dicho tejido a lo largo del desarrollo ([5800]).

La Leptina ejerce sus funciones a través de la unión al receptor ObR ([7541], [7622]). Éste forma parte de la familia de receptores citoquinas clase I y se expresa en varios tejidos como son el cerebro, placenta, pulmón, endometrio y estomago ([6677], [7622], [7659], [7660], [7661], [7662]). En cuanto a las funciones fisiológicas, la Leptina informa al hipotálamo de los niveles de reservas energéticas y adiposidad, el peso corporal y el estado nutricional, a la vez que participa en la regulación del apetito y la termogénesis ([5795], [5797], [6658], [7622]). En caso de producirse un incremento de peso corporal, la secreción de Leptina aumenta y, juntamente con la hormona Insulina, actúa a nivel hipotalámico reduciendo el apetito y la ingesta, al mismo tiempo que se promueve el gasto energético. Se ha descrito que dicho gasto se realizaría promoviendo la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Asimismo, Leptina inhibe la secreción de orexígenos a nivel hipotalámico, como es el caso del Neuropeptido Y (NPY) en el núcleo ARC ([6625], [7544], [7665]).

Tal y como se ha comentado anteriormente, la reproducción está muy relacionada con el estado metabólico. En este sentido, la Leptina está involucrada en la función reproductora, considerándose el marcador clásico del inicio de la pubertad hasta el descubrimiento del neuropeptido Kisspeptina. Desde entonces se considera que actúa como una señal permisiva esencial e implicada en el mantenimiento de la capacidad reproductora en edad adulta, en caso de haber reservas energéticas suficientes ([6060]). Actualmente está establecido que Leptina actuaría como un importante regulador del sistema hipotalámico de Kisspeptina. De esta manera, se propone que los niveles periféricos de Leptina servirían de información, modulando

así la funcionabilidad del eje reproductivo, específicamente de las neuronas GnRH, mediante la acción sobre neuronas kiss hipotalámicas ([5796], [5869]). De hecho, algunos autores han descrito el aumento de la expresión de ObR en dichas neuronas en el inicio de la pubertad ([5799]). Por otro lado, existen evidencias en la literatura en que la Leptina actuaría sobre el inicio de la pubertad de forma independiente de las neuronas kiss ([7537]).

La Adiponectina es una hormona codificada por el gen apM1, sintetizada principalmente en el tejido adiposo y que realiza sus funciones mediante la unión a su receptor AdipoR ([7541], [7542], [7553]). Adiponectina está involucrada en el metabolismo lipídico y el mantenimiento de la energía homeostática, aunque a diferencia de las otras adipoquinas, sus niveles están inversamente correlacionados con el acumulo central de grasa ([7663], [7666], [7667], [7670]). Se la considera una hormona sensibilizadora a la Insulina. En este sentido entre sus acciones está la disminución de la producción hepática de glucosa, el desencadenamiento de la función hepática de la Insulina y la disminución de las concentraciones de glucosa, ácidos libres y triacilglicéridos ([7658]).

Por otra parte, las adipoquinas Leptina y Adiponectina han sido relacionadas con otras funciones. Así, se ha atribuido a la Leptina un papel en el desarrollo epitelial de la glándula mamaria promoviendo la proliferación celular ([4865]). Además, se ha descrito una expresión de su receptor en tumores hipofisarios e intracraniales, carcinomas hepatocelulares y cáncer de mama ([6979], [7663], [7668], [7669]). En cuanto a Adiponectina, ésta realizaría una función opuesta a Leptina, es decir, estaría inhibiendo la proliferación celular. Por este motivo, se postula sobre la importancia de los niveles de ambas adipoquinas y sus respectivos receptores en la carcinogénesis mamaria ([5797], [7541], [7542], [7544], [7545], [7546], [7550], [7654]).

En cuanto a los factores nutricionales, estos son esenciales para un adecuado crecimiento y maduración sexual. En roedores se ha descrito que un déficit nutricional en edades perinatales puede alterar el desarrollo reproductivo, concretamente retrasaría el desarrollo de las gónadas, la apertura vaginal y el primer estro, por lo que globalmente, el inicio de la pubertad estaría retardado. En relación a esto, tal y como se ha comentado, es necesario llegar a un determinado peso y un cierto grado de tejido adiposo para que se inicie la pubertad ([5423], [5795], [5797], [7664]). La nutrición postnatal es igual de importante ya que, por ejemplo, una dieta desequilibrada durante la edad peripuberal puede afectar el grado de adiposidad y la pubertad. En este sentido, una dieta con elevada cantidad de grasas puede producir el adelantamiento de la pubertad ([5975], [6093], [6828], [7616], [7664]). Este efecto, no obstante, parece depender del tipo de grasa consumida. Así, distintos tipos de

grasas de la dieta pueden afectar de diferente manera al peso y masa corporal, influenciando a la vez el metabolismo del tejido adiposo ([6599]). El mecanismo de este efecto diferencial podría estar directamente relacionado con las características de los ácidos grasos, como son el tipo de estructura, la longitud de la cadena o el grado de insaturación (número de dobles enlaces). Está descrito que dichas características pueden influenciar en el destino metabólico de dichas grasas ([7475]). Estas evidencias estarían de acuerdo con estudios epidemiológicos que han asociado diferentes patrones dietéticos con el riesgo de desarrollar obesidad. Así, por ejemplo, la dieta mediterránea cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva, ha sido inversamente asociada con la obesidad, a pesar del contenido de grasa relativamente elevado de dicha dieta ([7102], [7625]).

La obesidad, además de su influencia sobre el crecimiento y la maduración sexual, tiene otras importantes consecuencias sobre la salud, y se la ha asociado con algunos tipos de cáncer. Existen evidencias de que una mayor adiposidad es un factor de riesgo del cáncer de páncreas, colorectal, endometrio y riñón, así como cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas ([6093]).

Uno de los mecanismos por los cuales una dieta basada en aceite de oliva podría tener efectos beneficiosos sobre el peso corporal, sería a través de la molécula oleiletanolamida (OEA) ([7168], [7210]). La OEA es un ácido graso etanolamida, también conocido como N-aciletanolamida. Ésta familia de moléculas lipídicas señalizadoras se localizan principalmente en el intestino delgado, tejido adiposo, neuronas aferentes y en varias zonas del cerebro. Está descrito que existe una fuente de OEA exógena a través de la ingesta de nutrientes con ácido oleico, así como una fuente endógena. En este caso se sintetiza a partir de fosfatidilcolina cuando las células son estimuladas por agentes despolarizantes, neurotransmisores y hormonas ([7168], [7178], [7206], [7218]).

OEA juega un papel importante en el control central y periférico de la ingesta, que se produce de forma integrada con el control nervioso y hormonal de la saciedad ([7206]). Así, esta etanolamida tiene efectos sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa, contribuyendo a la disminución del peso corporal y en el control del gasto y acumulo de energía. En este último caso, está descrito que OEA inhibe el transportador de la Insulina GLUT4 y el metabolismo adipocítico mediante las moléculas quinasas p38 y JNK ([7206], [7212], [7495]).

Una de las acciones más importantes a nivel periférico de la OEA es la regulación de la absorción de los ácidos grasos en la mucosa del intestino delgado a través del PPAR $\alpha$ . Este receptor activa genes que codifican proteínas implicadas en el transporte de lípidos a intestino

y tejido adiposo. Esta activación deriva en el incremento de la captación de ácidos grasos en los enterocitos y en la  $\beta$ -oxidación de lípidos en el tejido adiposo, contribuyendo así, a la utilización de la energía y a la disminución del peso corporal, respectivamente. Por otro lado, OEA también ha sido involucrada en la inhibición de la motilidad y tránsito intestinal ([7168]). También se le ha atribuido un efecto sobre el control del peso corporal, mediante la activación de PPAR $\alpha$  como por ejemplo la proteína desacopladora tipo 2 (UCP-2), la cual está implicada en el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la disipación de energía en forma de calor ([7495]). Asimismo, se ha descrito que en condiciones de frío, se activaría la formación de OEA en el tejido adiposo, por acción de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, participando en la movilización de las reservas de grasas ([7180], [7498]). Por otro lado, se considera que OEA ejerce otros efectos a corto plazo, también a través del PPAR $\alpha$ , por ejemplo desencadenando mecanismos no transcripcionales comparables a los que realizan los receptores de estrógenos y la vitamina D. Estos mecanismos incluirían la activación de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), NOS y Guanilil Ciclasa ([7178], [7179], [7210]).

Otra diana molecular de OEA es el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) que se expresa principalmente en neuronas sensoriales distribuidas a lo largo del tracto gastrointestinal. Así, mediante la unión de OEA a dicho receptor, se activan neuronas aferentes que transmiten la información al núcleo del tracto solitario del sistema nervioso central a través del nervio vago. A partir de ahí dicha información pasaría al núcleo hipotalámico paraventricular, el cual integra la información de las señales centrales y periféricas de saciedad, desencadenando una respuesta autonómica que acaba ajustando el balance entre la energía en forma de alimento que se ha ingerido y la utilizada ([7168], [7178], [7211], [7218]).

## **2. RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS.**

### **2.1. Aspectos Generales.**

#### **2.1.1. Hormonas Esteroideas.**

Las hormonas esteroideas están implicadas en el crecimiento, la diferenciación y el funcionamiento del útero, la vagina, los ovarios, el oviducto y la glándula mamaria ([5890], [6681]). Participan en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos como diferenciación, desarrollo, proliferación celular, apoptosis, inflamación y metabolismo, entre otras ([5662], [5685]). Las células esteroideogénicas son las responsables de la síntesis de estas

hormonas a partir del colesterol, y éste se puede producir *de novo* o bien es captado por las lipoproteínas plasmáticas ([6842]).

Las hormonas esteroideas que juegan un papel importante en el cáncer pertenecen a tres familias hormonales: estrógenos, progestágenos y andrógenos. Los estrógenos se producen principalmente en ovarios, pero también en testículos y, en pequeñas cantidades, en las glándulas suprarrenales.  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) es el principal estrógeno en humanos y regula el crecimiento y la fisiología de tejidos del tracto reproductor y órganos en hembras activando, a través de sus receptores, la transcripción de genes diana. Además  $E_2$  presenta efectos rápidos no genómicos atribuidos a la señalización iniciada en la membrana celular. Por otro lado, en ratas macho, los estrógenos, a través de sus receptores, modulan la acción de los andrógenos durante las diferentes fases del descenso testicular ([5677]).

La progesterona es la hormona más importante de los progestágenos y se sintetiza predominantemente en el cuerpo lúteo durante la segunda parte del ciclo menstrual. Durante el embarazo, la placenta produce cantidades muy elevadas de progesterona para autoabastecerse de hormona y mantener la función reproductora.

### **2.1.2. Receptores de Hormonas Esteroideas.**

Los receptores de las hormonas esteroideas pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales se caracterizan por el control de la expresión de genes diana en respuesta a la activación del ligando (la hormona) u otras señales ([5686]). La unión de la hormona a su receptor, principalmente en citoplasma, resulta en su activación, localización nuclear, formación de homo o heterodímeros, y la consecuente modulación de la transcripción de estos genes. Esta se puede producir de forma directa, específica y rápida, mediante la unión a los elementos de respuesta a hormonas (“Hormone Response Elements”, HREs) presentes en los promotores de genes diana ([2349], [2645]). Los productos de estos genes de respuesta rápida (“early genes”) son factores de transcripción que, a su vez, controlan la expresión de genes de respuesta tardía (“late genes”). También puede producirse una regulación indirecta a través de la interacción del receptor con factores de transcripción implicados en la expresión de otros genes. Además, se ha descrito un mecanismo de acción independiente de estrógenos en el que otros estímulos pueden activar el receptor, como factores de crecimiento, neurotransmisores y moléculas de señalización ([5672]).

### Receptores de Estrógenos (RE)

El mecanismo de acción clásico de  $E_2$  se da principalmente a través de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ ). En humanos, están codificados por genes diferentes, localizados en distintos cromosomas, pero con una organización funcional común. Asimismo, las proteínas de ambos receptores presentan una elevada homología estructural. Sin embargo,  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  poseen diferente capacidad de unión al ligando y al ADN, muestran distintos patrones de regulación y propiedades funcionales diferentes, siendo  $RE\alpha$  un activador transcripcional mucho más potente que  $RE\beta$  ([3403], [5817], [6813]).

El gen de  $RE\alpha$  presenta 7 promotores distintos que dan lugar a diferentes variantes según el tipo celular. Por otro lado, se han descrito 5 isoformas de  $RE\beta$  en humanos generadas a partir de *splicing* o unión alternativa, entre las que destaca  $RE\beta1$  y  $RE\beta2$ . En general,  $RE\beta2$  puede unirse al ligando pero con mucha menos afinidad que  $RE\alpha$  y  $RE\beta1$ , asimismo presenta una capacidad reducida para activar la transcripción de genes sensibles a estrógenos ([3405]). En cuanto a  $RE\beta1$ , este presenta una afinidad reducida por el estradiol, así como su capacidad de activar la transcripción inducida por dicha hormona ([5849]).

$RE\alpha$  y  $RE\beta$  son co-expresados en determinados tejidos diana, aunque ambos también muestran un perfil de expresión celular y tisular diferentes. En rata, ambas isoformas se expresan en menor o mayor grado en distintos tejidos, aunque en útero y ovario se han descrito elevadas cantidades de ambos, mientras que en glándula mamaria su expresión varía a lo largo del desarrollo ([5817], [6802], [6816]).

$E_2$  estimula la expresión de genes diana fundamentalmente a través de  $RE\alpha$ , sin embargo,  $RE\beta$  regula de manera dominante la señalización de  $E_2$ . Se postula que las diferencias entre las actividades de ambas isoformas podrían ser debidas a su distinta habilidad para interactuar con proteínas co-reguladoras. Cabe señalar que  $RE\beta$  realiza una acción antagonista de las respuestas mediadas por  $RE\alpha$ , pero dicha acción está restringida a un número limitado de genes y no representa el mecanismo general en la señalización de los receptores de estrógenos. De hecho, en ausencia de  $RE\alpha$ ,  $RE\beta$  media, parcialmente, los efectos de los estrógenos sobre la transcripción de genes ([5782]).

En tejidos donde co-expresan ambas isoformas del receptor,  $RE\beta$  podría tener un papel atenuador de  $RE\alpha$ , inhibiendo su actividad transcripcional, a través de la formación de heterodímeros  $RE\alpha$ - $RE\beta$  ([5685], [6801], [6806]). Entre todas las posibilidades, parece ser que  $RE\beta2$  muestra preferencia por la heterodimerización con  $RE\alpha$ , inhibiendo así su unión al

ADN, o bien estimulando la degradación dependiente de proteosoma, ejerciendo así, un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional de RE $\alpha$ . Este último mecanismo de acción no se ha observado en RE $\beta$ 1 ([5894], [5895], [6824]).

Diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales regulan las funciones de RE, así por ejemplo la fosforilación de RE $\alpha$  se asocia a un incremento en la actividad transcripcional, así como a la degradación del receptor mediada por proteosomas ([6799]). Por otra parte la palmitoilación de RE $\alpha$  y RE $\beta$  estimula la localización del receptor en membrana, lo que favorece la activación de vías de señalización no genómicas implicadas en proliferación celular, entre otras funciones ([5844], [5895], [6798]). Esta acción no genómica estaría mediada mayoritariamente por RE $\alpha$  ([5672], [6805]). La localización en membrana está asimismo, determinada por la asociación con otras proteínas, como por ejemplo la proteína de unión Caveolina-1, la cual actúa como molécula de anclaje de RE $\alpha$  en microdominios de membrana, concretamente en las caveolas ([5889]).

Además de las vías de activación directas e indirectas mencionadas, se ha descrito un mecanismo de acción de RE independiente de ligando. Un ejemplo de ello sería la fosforilación del receptor, o de sus co-reguladores, por parte de ERK 1/2, p38MAPK, CDKs y Akt ([5672]). Se ha hipotetizado sobre la función de los receptores localizados en la membrana plasmática como “centinelas” de la respuesta hormonal, debido a que desencadenan rápidamente vías de transducción de señales, entre las que destacan las que implican Ras-MAPK, PI3K-Akt y PLC ([4716], [4718], [4719], [5892]). Los RE nucleares y de membrana plasmática tienen acciones diferentes pero complementarias, así, los RE de membrana puede amplificar los efectos de los RE nucleares ([5891]).

### Receptores de Progesterona (RP)

Tanto en humanos como en rata, se han descrito dos isoformas, RP-A y RP-B, codificadas por un mismo gen a partir de promotores diferentes. En la mayoría de los contextos celulares, RP-B es un activador de la transcripción génica muy potente, mientras que RP-A puede actuar como un represor *trans* de RP-B y de otros receptores esteroideos, como RE, o formando heterodímeros ([5685]). RP-A y RP-B co-expresan en la mayoría de los tejidos diana, sin embargo, su ratio depende del tipo celular y las condiciones hormonales, como por ejemplo durante el ciclo estral o después de la maduración sexual. Según estudios

en ratones, RP-A tendría el papel dominante en útero y ovario, mientras que RP-B sería más importante en glándula mamaria ([6811]).

La expresión de las isoformas de RP está diferencialmente regulada por estradiol y progesterona según el tejido. En hipotálamo de rata, los niveles de ARNm de RP-A y -B son inducidos por estradiol mientras que la progesterona los disminuye ([5656]). Sin embargo, en hipocampo el estradiol induce únicamente la expresión de RP-A, mientras que no modifica la de RP-B ([6848]). En útero de rata, la progesterona disminuye los niveles de expresión de RE $\alpha$  a la vez que aumenta los niveles de RE $\beta$ . Este efecto diferencial podría ser la causa de los elevados niveles de RE $\beta$  y bajos de RE $\alpha$  detectados en ovario ([5676]).

A través de las vías de señalización descritas anteriormente, los RE pueden interactuar con los RP para modular las respuestas. Katzenellenbogen ([5893]) propuso la teoría que en el promotor de los genes diana se encuentran elementos de respuesta a estrógeno y a progesterona. Así, los complejos RP-ligando pueden suprimir la actividad de RE estimulada por estradiol a nivel de la interacción del receptor con el complejo de transcripción. La magnitud de esta represión depende de la isoforma (RP-A es más efectivo que RP-B), del ligando, del promotor y del tipo celular.

Por último, se ha descrito una señalización rápida mediada por RP en la membrana plasmática que puede regular la expresión de genes importantes en cáncer de mama, independientemente del receptor nuclear ([6819]).

## **2.2. Expresión de RE y RP en Glándula Mamaria.**

Los esteroides del ovario, estrógenos y progesterona, son cruciales para el desarrollo de la glándula mamaria en humanos. En cuanto a los receptores, RE $\beta$  es el más abundante, ejerciendo un papel pro-diferenciador, mientras que RE $\alpha$  es esencial para el crecimiento de los ductos, y por tanto, es imprescindible para un correcto desarrollo de la glándula ([6807]). Los receptores de esteroides muestran diferentes patrones de expresión en glándula mamaria de humanos, y éste a su vez, es distinto del que presentan los roedores ([5820], [5847]). Estas diferencias estarían relacionadas con una organización ductal más predominante en el epitelio mamario de roedores que en el de humanos.

En mujeres pre-menopáusicas, menos del 20% de las células epiteliales mamarias expresan RE $\alpha$ , y estas raras veces proliferan, mientras que las células que lo hacen no expresan RE $\alpha$ . Se cree que las primeras ejercerían un control paracrino sobre las células

epiteliales que están proliferando. Además, en estas mismas células que contienen RE $\alpha$ , se localiza RP inducido por estrógenos ([5847], [6797]).

Los niveles de expresión del ARNm de RP-A y RP-B también difieren durante el desarrollo de la glándula mamaria humana. Así, en la glándula inmadura y adulta virgen, RP-A es altamente expresado, lo cual sugiere la posibilidad que la progesterona esté implicada en el desarrollo ductal ([5890], [6810]). Por el contrario, RP-B sólo se detecta durante el embarazo en células epiteliales alveolares donde co-expresa con marcadores de proliferación como Ciclina D1. Durante la lactancia se da una ausencia de ambos receptores, y tras la involución RP-A vuelve a expresarse aunque de forma menos intensa que antes del embarazo ([5890]).

En la glándula mamaria de rata, RE $\beta$  se expresa de manera constante tanto en núcleo de células epiteliales como estromales. En cambio, RE $\alpha$  varía a lo largo del ciclo estral en células epiteliales, así como a lo largo del embarazo, alcanzando los niveles máximos en la lactancia. Este perfil de expresión de RE $\alpha$  se correlaciona de forma inversa con la tasa de proliferación de la glándula mamaria. Por otro lado, la ratio RP-A:RP-B es importante para un correcto desarrollo de la glándula mamaria de rata ([6795]). Ambas isoformas se expresan en todas las etapas del desarrollo mamario excepto en la lactancia, donde no se detecta expresión de ninguna de ellas. Se ha observado una correlación temporal entre el desarrollo del lóbulo, antes y durante el embarazo, y la expresión de RP-B en glándula mamaria de rata y humana. Esta situación sugiere que RP-B es necesario para el desarrollo lobuloalveolar de la glándula mamaria ([5789]).

Por otro lado, la expresión de RE y RP varía a lo largo del ciclo menstrual en humanos y el estral en ratas. Durante el ciclo menstrual, la mayoría de las células que proliferan en glándula mamaria no contienen RE $\alpha$ , pero se dividen como respuesta a las señales paracrinas procedentes de células que sí expresan RE $\alpha$ . En mujeres adultas, no gestantes ni lactantes, la máxima actividad proliferativa de la glándula mamaria se produce durante la fase luteal del ciclo menstrual, coincidiendo con niveles elevados de E<sub>2</sub> y progesterona ([5789]). Asimismo, durante el ciclo estral, se produce una disminución de dicho receptor alrededor del pico de estrógenos al final del diestro, siendo los más altos en proestro ([6007]). En cuanto a RE $\beta$ , los cambios son menos evidentes a lo largo de cada ciclo ([6682]), y respecto a RP-A y RP-B, ambos receptores sufren pequeñas variaciones durante el ciclo menstrual, así como su ratio en determinadas regiones cerebrales ([5656]).

### 2.3. Expresión de RE y RP en Cáncer de Mama.

Los estrógenos son los promotores principales de la proliferación celular en epitelio mamario normal y neoplásico, y están implicados en el desarrollo de otros tipos de cáncer como el de ovario, de colon, de próstata y endometrial.

La regulación del crecimiento de los tumores mamaros hormonodependientes es compleja ya que son diversas las hormonas que regulan la producción de receptores esteroideos y por otra parte, los estrógenos controlan la expresión de genes que participan en la proliferación y el crecimiento del epitelio mamario. En este sentido, una estimulación excesiva de dichas vías, por un aumento de estrógenos o del receptor, supone un aumento del riesgo de generar cáncer ([5673]). Asimismo, dentro de las dianas moleculares de los estrógenos se encuentran genes implicados en la progresión del ciclo celular, la regulación de la sensibilidad de las células tumorales a determinadas hormonas y factores de crecimiento y la producción de estos últimos, los cuales juegan un papel autocrino y paracrino en la regulación del cáncer de mama ([1870], [2428]).

En los tumores experimentales hormonodependientes, los estrógenos estimulan la síntesis de su receptor y la de RP ([494], [1110]). Al activarse RE $\alpha$  en las células epiteliales de carcinomas mamaros, este activa a su vez RP ([5265], [6794]). La progesterona ejerce su efecto antiestrogénico inhibiendo la síntesis del RE y la de su propio receptor, favoreciendo la transformación de E<sub>2</sub> en estrona y bloqueando el efecto estimulador de la prolactina sobre la síntesis del RE ([470], [490], [493], [494], [1110], [3321]). El crecimiento inducido por E<sub>2</sub> parece efectuarse a través de factores de crecimiento secretados por las células que juegan un papel autocrino y paracrino en la regulación del cáncer de mama ([1585], [2428]).

Los estrógenos aumentan los factores que estimulan el crecimiento tumoral mamario (EGF/TGF $\alpha$  e IGF-I), e inhiben los que la frenan (TGF $\beta$ ). A su vez, el EGF es capaz de regular negativamente los niveles de RE así como la síntesis de RP, estimulada por estradiol ([1669]). Así, existe una correlación negativa entre el “status” del receptor estrogénico y la sobreexpresión del receptor del EGF (EGFR). La positividad para el receptor de este factor de crecimiento (EGFR+/ RE-) se asocia con una mayor agresividad del tumor mamario y por tanto constituye un factor de mal pronóstico ([1572], [2421]).

Por otro lado, en los tumores hormonoindependientes se secretan grandes cantidades de factores de crecimiento en ausencia de estrógenos y además los niveles de estos polipéptidos no se alteran al añadir dichas hormonas. Estudios *in vitro* sugieren que la

activación de determinados oncogenes podría ser responsable de la regulación positiva de dichos factores, sobrepasando totalmente el papel regulador de los estrógenos (teoría del “bypass” oncogénico) ([1870], [1948]).

RE $\alpha$  se encuentra implicado en la iniciación y progresión en cáncer de mama, siendo el principal mediador endógeno de la acción rápida de E<sub>2</sub> dirigida hacia la proliferación celular, mientras que el papel de RE $\beta$  en el efecto proliferativo de E<sub>2</sub> no es bien conocido ([5782]). Aún así, se postula que RE $\beta$  pueda actuar como supresor de tumores modulando los efectos de RE $\alpha$  al heteromerizar con este, disminuyendo así el efecto proliferativo de los estrógenos y ejerciendo un papel protector contra el desarrollo del cáncer ([4505], [5659], [5895]). En este efecto antagonista entre RE $\alpha$  y RE $\beta$  no está claro si el papel de RE $\beta$  es inducir la apoptosis u otras vías de transducción de señales ([5844], [6814]). En cualquier caso, esta represión podría ser una de las causas por las que la expresión de RE $\beta$  disminuye en la carcinogénesis mamaria ([6803], [6846]).

Estudios en humanos han detectado un aumento de RE $\alpha$  en la transición de tejido normal a maligno, mientras que los niveles de RE $\beta$  disminuyen durante la progresión del cáncer de mama ([6845]). Otros estudios sugieren que la ratio de expresión relativa RE $\alpha$ /RE $\beta$  incrementa con el aumento de la proliferación y del riesgo de cáncer de mama en lesiones premalignas ([6803]). Además, se ha encontrado una correlación positiva entre la síntesis del RE $\beta$  y una baja proliferación y un bajo grado histopatológico ([6822]). En rata, la expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  disminuye de forma significativa en los tumores mamarios respecto a la glándula mamaria normal ([5678]).

Relacionado con la acción rápida no genómica de los estrógenos, en cáncer de mama se ha demostrado que el efecto anti-apoptótico de E<sub>2</sub> se da a través de los RE que se encuentran en la membrana plasmática ([6680]). Estos receptores activan, principalmente, la vía de señalización ERK/MAPK confiriendo al tumor un comportamiento agresivo ([5892]).

En relación a la progesterona, elevadas cantidades de esta hormona, en combinación con el estradiol, tienen una actividad proliferativa importante en glándula mamaria adulta de roedores y humanos, mediada por RP ([5655], [6818]). De este modo, la progesterona contribuye a aumentar el riesgo de cáncer de mama ([5890]). Aún así, en general, la síntesis de RP es de buen pronóstico, mientras que la pérdida de RP indica mayor agresividad tumoral y mayor probabilidad de metástasis ([5660]). Por otro lado, en la mama humana adulta premenopáusicas, RP-A y RP-B se expresan en cantidades equimolares en células epiteliales, sin

embargo, esta ratio cambia en cáncer de mama. Una elevada penetrancia de RP-A está asociada con peor pronóstico, mientras que la prevalencia de RP-B está asociada con la ausencia de la expresión HER2/neu y con un fenotipo tumoral más diferenciado ([6812]).

La mayor parte de estudios en rata no discriminan entre las dos isoformas de RP, pero se considera que la progesterona induce proliferación celular directamente a través de RP-B, aunque este mismo mecanismo podría darse de forma paracrina a través de RP-A. En las diferentes estructuras de la glándula mamaria, RP-B co-localiza con marcadores de proliferación, sin embargo cuando en la misma célula se expresan RP-A y RP-B ésta no prolifera ([5789]). Esta situación sugiere que RP-A podría ejercer algún efecto inhibitor sobre la actividad proliferativa de RP-B. En general, en cáncer de mama experimental, las células RP+ proliferan ([3965], [5890]).

Otros receptores esteroideos implicados en el cáncer de mama son los receptores de andrógeno (RA), de glucocorticoides (RG), de retinoides (RAR y RXR) y de vitamina D (RVD). Son necesarios más estudios para conocer el papel de estos receptores en las diferentes etapas de la carcinogénesis.

#### **2.4. Lípidos de la Dieta, Receptores Esteroideos y Cáncer de Mama.**

La ingesta de ácidos grasos puede alterar el desarrollo del tumor mamario aumentando los niveles de estrógenos, pero poco se conoce acerca de los posibles efectos sobre los niveles de los receptores esteroideos. En algunos estudios, la ingesta de dietas ricas en grasas no ha mostrado influencias sobre los niveles de los receptores de estrógenos y progesterona ([1046], [5664]). Sin embargo, otros estudios realizados en mujeres post-menopáusicas han encontrado una asociación positiva entre el consumo de ácidos grasos saturados y el riesgo de cáncer de mama. Esto es debido a que el tejido adiposo es la principal fuente de estrógenos en este grupo de mujeres, procedentes de la actividad aromataasa (CYP19), que cataliza la conversión de andrógenos, secretados por la glándula adrenal, en estrógenos ([4595]). Así, un elevado riesgo de cáncer de mama entre mujeres post-menopáusicas con elevado peso corporal puede estar asociado con un aumento de estrógenos ([6823]). Se ha postulado que la obesidad afecta el desarrollo del cáncer de mama en etapas tempranas en la tumorigénesis, sin alterar el estado de receptores de estrógenos en el tumor ([5887]). A pesar de los trabajos que tratan de relacionar cambios en el nivel de receptores de esteroides gonadales con los lípidos de la dieta, hasta el momento no hay datos concluyentes ([1046], [2265]).

En rata, una dieta rica en PUFA n-6 aumenta el nivel de RE en la glándula mamaria de animales vírgenes. En ratas gestantes, dicha dieta aumenta los niveles de RE, sin embargo, en la descendencia los niveles de RE en glándula mamaria disminuyen significativamente, en asociación con una disminución de la diferenciación epitelial a favor de un mayor número de estructuras dianas de la transformación maligna ([3588]).

En el subapartado D.2 de este capítulo se detallan otros efectos de los lípidos de la dieta sobre la carcinogénesis mamaria a través de los receptores esteroideos.

### **3. ESTRÉS OXIDATIVO.**

#### **3.1. Definición de Estrés Oxidativo.**

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre sistemas oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros ([6417]). Los sistemas oxidantes, o radicales libres, son producidos en el metabolismo aeróbico normal y pueden ser generados en grandes cantidades bajo condiciones fisiológicas. Existen evidencias que indican que un estado de estrés oxidativo puede conducir al daño celular y tisular, y este a su vez, puede ser contrarrestado por la célula mediante mecanismos antioxidantes capaces de eliminar la mayoría de oxidantes y radicales potencialmente dañinos ([5419], [6418]). Sin embargo, se produce daño oxidativo en proteínas (enzimas celulares y proteínas estructurales), lípidos (membranas), carbohidratos (azúcares simples y compuestos) y ácidos nucleicos (ADN y ARN), incluso bajo condiciones fisiológicas normales por lo que el organismo actúa mediante enzimas para eliminar los productos oxidados. Así, por ejemplo, las enzimas proteolíticas degradan proteínas oxidadas como en el caso de la fosfolipasa A2 reconoce y elimina los lípidos de membrana oxidados, o mediante distintas enzimas de reparación el ADN que ha sido modificado es eliminado o reparado ([6419], [6464]). Un exceso de producción de especies reactivas, por encima de la capacidad antioxidante de la célula, podría causar daño en proteínas. Esta inestabilidad de macromoléculas puede representar la base molecular de diversas enfermedades, como procesos inflamatorios, alteraciones cardiovasculares y cáncer. Así, existe un delicado equilibrio entre oxidantes y antioxidantes en la salud y la enfermedad ([6418]).

### 3.2. Concepto de Radical Libre. Tipos.

Un radical libre es una molécula o fragmento de ella que contiene uno o más electrones desapareados en su última capa, lo cual confiere una gran reactividad. La principal fuente endógena es la mitocondria, debido a que la generación de radicales libres se encuentra relacionada con el metabolismo aeróbico y la síntesis de ATP que se produce en dicho orgánulo ([6138]). Por otra parte, los organismos viven expuestos a muchos agentes ambientales oxidantes, por ejemplo a través de comidas, medicamentos y drogas ([6419]).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las del nitrógeno (RNS) representan la clase de radicales más importante generados por sistemas biológicos, y ambas pueden actuar de forma beneficiosa o perjudicial en dichos sistemas. Por ejemplo, a bajas concentraciones de ROS, éste induce respuestas mitogénicas, mientras que si éstas son elevadas, puede causar daño en lípidos de membrana, ADN y proteínas y en la peroxidación de lipoproteínas. En cuanto a RNS, puede inactivar los complejos de la cadena respiratoria e inhibir la síntesis de proteínas y de ADN ([6078], [6443]).

Existen varios tipos de radicales libres dentro de las ROS y RNS. Entre ellos destaca el anión superóxido ( $O_2^-$ ) que es producido principalmente en la membrana mitocondrial interna e interacciona con otras moléculas generando otros radicales de forma directa o a través de procesos catalizados por enzimas o metales. Por ejemplo puede transformarse en peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) mediante una reacción de dismutación ([6138], [6139], [6420], [6435], [6665]). Los niveles de  $H_2O_2$  están ligados al estado redox de la célula con un claro papel en la adaptación, proliferación, diferenciación, apoptosis y necrosis. Por otro lado, si no hay suficiente enzima catalasa o peroxidasas para descomponer el  $H_2O_2$ , este puede convertirse en el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) que es mucho más reactivo y presenta una gran habilidad para iniciar la peroxidación lipídica, así como para reaccionar con las bases del ADN dañándolas o produciendo roturas en las cadenas. Un ejemplo es la formación de la base modificada 8-oxo-deoxyguanosina (8-oxo-dG) que resulta de su interacción con la base guanina ([5812], [6448]). Otros radicales libres fisiológicos son el óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el radical peroxil ( $ROO^\cdot$ ) ([5419], [6147]).

### 3.3. Sistemas Antioxidantes Enzimáticos de la Célula.

El efecto de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno es contrarrestado por la acción de antioxidantes no enzimáticos, así como por enzimas antioxidantes, las cuales

actuarán de forma catalítica convirtiendo los agentes oxidantes en especies menos reactivas. Las defensas antioxidantes son extremadamente importantes debido a que representan una eliminación directa y específica de los radicales libres confiriendo máxima protección a la célula ([5812], [6138], [6419]).

Las enzimas Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa, y Glutación peroxidasa (GPx) forman la primera defensa contra la oxidación de metabolitos por radicales libres (Figura 7). En este sentido, la localización celular de dichas enzimas se encuentra funcionalmente relacionada con la localización de las fuentes de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ .

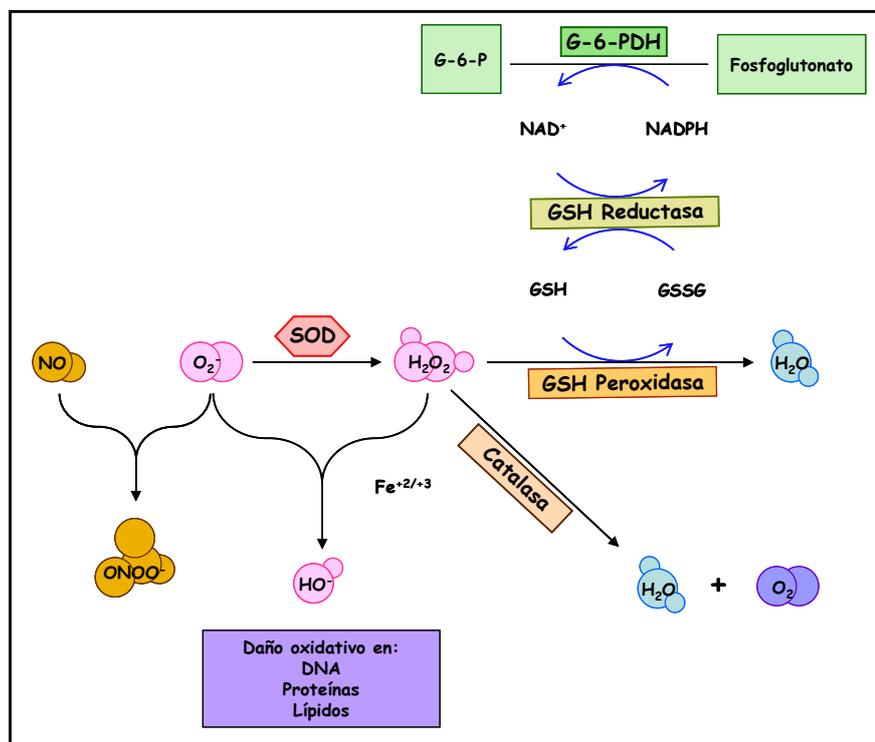


Figura 7. Sistemas antioxidantes celulares.

### 3.3.1. Superóxido Dismutasa (SOD).

SOD es una de las enzimas antioxidantes intracelulares más efectivas. Es la única en mamíferos que cataliza la dismutación de  $O_2^-$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$ , una especie menos reactiva. Si SOD no actuara sobre el radical anión superóxido, éste reaccionaría con el óxido nítrico para formar otro radical, el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) con la misma afinidad que SOD.

Existen diferentes formas de SOD las cuales difieren en la naturaleza del metal de su centro activo así como en el número de subunidades y cofactores, entre otros. En humanos se han descrito 3 isoformas con distinta localización celular: CuZnSOD, principalmente

citósica, MnSOD esencialmente mitocondrial y la isoforma extracelular, la ECSOD ([6438], [6482], [6491]). En general, están distribuidos en varios tejidos aunque en algunos de ellos se hallan los niveles más elevados, por ejemplo CuZnSOD destaca en hígado, riñón, eritrocitos y en el sistema nervioso central ([6077], [6485]).

Actualmente, todavía hay muchos datos contradictorios sobre el papel que desarrollan estas enzimas en la carcinogénesis y la biología del tumor. En el caso de MnSOD, sus niveles de actividad en tejidos no malignos, activos metabólicamente, normalmente son elevados. Se ha descrito como una de las enzimas antioxidantes más efectivas con actividad anti-tumoral, confiriendo resistencia oxidante y afectando al crecimiento y supervivencia de las células malignas ([5812], [6095], [6440], [6485]). Sin embargo, algunos estudios muestran un efecto contrario, donde MnSOD favorece el crecimiento y la invasión tumoral. En diversos tipos de cáncer, una sobreexpresión de MnSOD resulta en la activación de dos proteínas de la familia de metaloproteasas de la matriz, MMP-1 y MMP-2, las cuales favorecen, principalmente, la invasión tumoral ([6077], [6456]). Además, CuZnSOD ha sido relacionada tanto con el aumento ([6483]), como con la disminución ([6484]) de la capacidad invasiva tumoral. Asimismo, se ha observado que células malignas de carcinoma mamario tienen actividades elevadas de MnSOD y CuZnSOD respecto al tejido mamario no maligno ([6493]). Por el contrario, también se ha descrito que ciertos tumores muestran una actividad conjunta reducida de CuZnSOD y MnSOD ([6456]).

Finalmente, los estudios realizados sobre el papel de ECSOD en células cancerosas no son contundentes. En uno de los escasos estudios sobre ECSOD en cáncer, ECSOD transfectada en fibroblastos suprimió tanto la metástasis artificial como la espontánea a pulmón de rata ([6077]).

En definitiva, los efectos beneficiosos que se observan cuando se induce la sobreexpresión de SOD no serían exclusivos de la actividad de dicha enzima sino que ésta debe ir acompañada de un aumento de la actividad de otras enzimas antioxidantes complementarias como son la GPx y Catalasa, que eliminan el producto formado en la reacción catalizada por SOD. En caso contrario, se produciría una acumulación del peróxido de hidrógeno y un aumento del estrés oxidativo ([6147]).

### 3.3.2. Glutación Peroxidasa (GPx).

Las GPx constituyen una familia de enzimas que son capaces de reducir una gran variedad de hidroperóxidos orgánicos, como el colesterol y peróxidos de ácidos grasos de cadena larga e inorgánicos a sus correspondientes alcoholes ([6062]). GPx compite con la enzima Catalasa (véase siguiente subapartado) por  $H_2O_2$  como sustrato y es la principal fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo. Para llevar a cabo la reacción puede utilizar varias moléculas reductoras, entre ellas las proteínas Tiol, sin embargo muestra tener una elevada especificidad por el Glutación reducido (GSH) ([6136], [6505]). Cuando GPx descompone, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno en agua, simultáneamente, crea un puente disulfuro entre dos moléculas de GSH para dar lugar al glutación oxidado, GSSG ([6078]) (Figura 7).

La GPx citosólica (cGPx) es una de las 5 isoformas de la enzima Glutación peroxidasa descritas en humanos, la cual se sintetiza de forma ubicua aunque es particularmente abundante en eritrocitos, hígado y riñón ([6078]). Su principal función es reducir los hidroperóxidos solubles en agua. cGpx, es capaz de metabolizar los hidroperóxidos de ácidos grasos en fosfolípidos, únicamente en presencia de fosfolipasa A2 que libera los ácidos grasos ([6441]). Asimismo, trabajos realizados con ratones transgénicos inducidos con el carcinógeno DMBA presentaron un incremento de la expresión de cGpx así como una mayor respuesta frente a la iniciación del proceso carcinogénico ([6495]). Por otro lado, otros estudios describen una asociación entre un aumento de la actividad cGPx y una disminución de la apoptosis celular ([6666]). La implicación de cGPx en la progresión de un tumor se encuentra directamente relacionada con el nivel de selenio ingerido a través de la dieta. En este sentido, un suplemento de selenio en la dieta reduce la mortalidad asociada a carcinomas de pulmón, próstata y cáncer de colon ([6496], [6497]).

Otra de las isoformas de esta enzima es la fosfolípido hidroperóxido GPx (PHGPx). Ésta se localiza en citosol, mitocondria y núcleo, asociada a membranas y presenta especificidad de sustrato, ya que reduce hidroperóxidos orgánicos ([6062], [6142]). Asimismo, se caracteriza por tener una expresión ubicua y es la única peroxidasa esencial para la vida ([6510]). Se caracteriza por prevenir la peroxidación lipídica y su principal función es mantener el estado redox de la membrana y protegerla contra el daño oxidativo que se pueda producir por ejemplo por la acción de las lipoxigenasas ([6062], [6142], [6441]).

El ciclo redox del glutación es el mayor sistema de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo ([6138]). Sin embargo, la Catalasa es más importante a la hora de proteger

contra el estrés oxidativo severo. Además de GPx, en dicho ciclo participan las enzimas Glutación reductasa (GSR) y Glutación-S-transferasa (GST). Existen dos isoenzimas de GSR, una citosólica y otra mitocondrial, ([6071]) y ambas catalizan la formación de dos moléculas de GSH a partir de una molécula GSSG. De este modo mantiene un suministro constante de GSH desde GSSG para la actividad de las enzimas GPx (Figura 7). En cuanto a GST, esta superfamilia de enzimas catalizan la conjugación del Glutación con los compuestos diana para formar conjugados con GSH, los cuales serán modificados para ser excretados ([6078]).

### 3.3.3. Catalasa (CAT).

La enzima Catalasa está formada por 4 subunidades idénticas y está localizada en el peroxisoma, y es abundante en eritrocitos, hepatocitos y en riñón. Esta enzima promueve la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y una molécula de oxígeno (Figura 7). La Catalasa no actúa eficazmente sobre hidroperóxidos lipídicos, pero sí elimina el peróxido de hidrógeno de forma eficaz. De hecho, Catalasa presenta la tasa de intercambio más alta: una molécula de Catalasa puede convertir unos 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno por minuto ([5812]).

Los estudios del efecto de la actividad de Catalasa sobre el crecimiento de tumores de riñón e hígado en diferentes animales han asociado la disminución de la actividad con el crecimiento tumoral ([6619]). En general, esta disminución de la actividad de Catalasa en diversos tipos de cáncer se ha correlacionado con una disminución de la capacidad antioxidante del tumor.

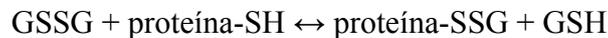
### 3.4. Sistemas Antioxidantes No Enzimáticos de la Célula.

Los compuestos antioxidantes no enzimáticos son sacrificados para ser oxidados y así proteger directamente a componentes importantes de la célula. Entre estos se encuentran las vitaminas C y E, los compuestos polifenólicos, el selenio y los antioxidantes tiol, entre otros.

La capacidad intracelular de mantener en condiciones normales el estado redox de los sistemas biológicos dentro de un rango de valores, viene dada, principalmente, por dos tipos de antioxidantes con compuestos tiol, el glutatión y la tioredoxina (TRx). Ambos son fácilmente oxidados y pueden ser rápidamente regenerados. De estos dos antioxidantes, el Glutatión es el más importante debido a que se considera el principal tampón redox de la célula multifuncional. El Glutatión se sintetiza *de novo* en hígado y realiza multitud de funciones, aparte de participar en la protección contra el estrés oxidativo. En este sentido, el

Glutación es un cofactor de distintas enzimas antioxidantes como la GPx y GST, además de eliminar radicales libres reaccionando directamente con ellos de forma no catalítica. Así, actúa al menos en parte, sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos de ácidos grasos a través de reacciones catalizadas por las diferentes isoformas de las enzimas GPx descritas anteriormente ([5419], [6065]) (Figura 7). Asimismo, es capaz de regenerar los antioxidantes más importantes, las vitaminas C y E, devolviéndolos a su forma activa ([6078], [6513]). El Glutación es muy abundante en citosol, núcleo y mitocondria, siendo el principal antioxidante soluble en estos orgánulos. El contenido intracelular de Glutación es sensible a los factores ambientales. Así, una exposición a radicales libres puede aumentar los niveles de Glutación en la célula, estimulando su síntesis. Así, el contenido intracelular de Glutación es el resultado del balance entre el uso y la síntesis, y por lo tanto un indicador del medio redox celular.

La forma reducida del Glutación es GSH, mientras que la forma oxidada es el Glutación disulfuro o GSSG. La ratio GSSG/GSH es un buen indicador del estrés oxidativo del organismo. El potencial reductor de la pareja GSSG/2GSH depende no únicamente de la ratio sino también de la concentración absoluta de GSH. Por otro lado, GSSG se acumula en la célula y puede reaccionar con los grupos sulfidrilo de proteínas parcialmente oxidadas para producir proteínas-Glutación unidas por un puente disulfuro:



Las proteínas-SSG pueden ser reducidas a proteína sulfridilo por la enzima Glutación reductasa (GR) y por pequeñas proteínas como glutaredoxina y TRx.

Como consecuencia de los efectos de GSH, la célula queda protegida de la apoptosis. Un gran número de estudios han establecido una asociación entre la incidencia de cáncer y alteraciones en la función de enzimas relacionadas con GSH ([5845], [6076], [6495]). Del mismo modo que disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes, la ratio GSH/GSSG medida en sangre de pacientes con cáncer de colon y mama presenta niveles inferiores al control ([6530]).

### **3.5. Consecuencias del Estrés Oxidativo.**

Debido al tiempo que transcurre desde que se generan los oxidantes hasta su destrucción por mecanismos de defensa, pueden existir bajos niveles de radicales libres en la célula el tiempo suficiente como para producir daño en macromoléculas celulares así como en los ácidos nucleicos. En situaciones de estrés oxidativo, aumenta la probabilidad de que los radicales libres generen lesiones en la célula.

### 3.5.1. Daño Oxidativo en el ADN.

Para evitar el daño en el ADN nuclear, la célula ha desarrollado una estrategia de protección, por lo que en conjunto, el ADN nuclear se encuentra bien protegido de los oxidantes, aunque no completamente. En cambio, el ADN mitocondrial no tiene la misma situación, por lo que es más susceptible al daño genómico por oxidación. El nivel de bases oxidadas en el ADN mitocondrial es de 10 a 20 veces mayor que en el ADN nuclear ([6138], [6143]).

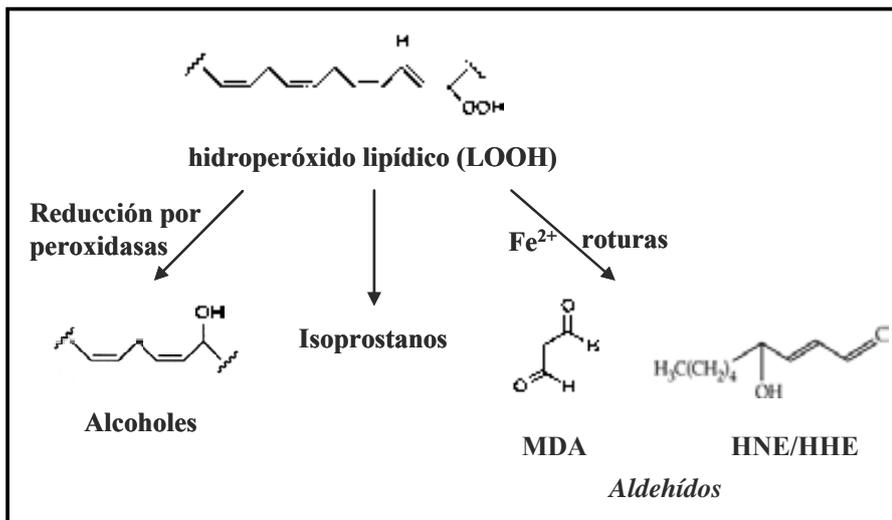
A nivel molecular, los productos de oxidación formados en el ADN incluyen roturas simples o de doble hebra, bases sin el azúcar o lugares apurínicos, uniones cruzadas del ADN y bases oxidadas como por ejemplo la 8-oxo-dG. Esta base modificada es el principal producto de oxidación del ADN con potencial mutágeno y carcinogénico, asimismo es considerada un buen marcador del estrés oxidativo de un organismo y, potencialmente, un biomarcador de la carcinogénesis. Los niveles de 8-oxo-dG determinados en el ADN hidrolizado de linfocitos o en tejido representan el resultado entre el daño y su reparación ([6074], [6143]). En la mayoría de los casos, 8-oxo-dG resulta en una sustitución  $G \rightarrow T$ , aunque también puede causar una sustitución  $A \rightarrow C$  ([6521]). Otro tipo de daño en el ADN son los aductos premutagénicos generados por productos de la peroxidación lipídica, los cuales se encuentran detallados en el siguiente subapartado.

### 3.5.2. Daño Oxidativo en Lípidos. Peroxidación Lipídica.

Entre las macromoléculas celulares, los PUFA son los que muestran mayor sensibilidad a sufrir daño oxidativo. Los lípidos que contienen PUFA están sujetos a la oxidación iniciada por radicales libres y pueden participar en reacciones en cadena que amplifican el daño a otras biomoléculas. Los lípidos de membrana, principalmente los fosfolípidos, contienen PUFA altamente susceptibles a la peroxidación ([4904]). Se admite la hipótesis que la sensibilidad de los lípidos aumenta en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso ([6422]). De este modo, los ácidos grasos monoinsaturados y saturados, con uno o ningún doble enlace, respectivamente, son mucho menos reactivos y normalmente no participan en la peroxidación lipídica, aunque sí pueden ser oxidados ([6421]).

La peroxidación lipídica controlada puede tener efectos beneficiosos para la célula y el organismo entero. Estos efectos se dan a nivel de síntesis de eicosanoides, maduración celular, movilización de lípidos y activación de vías de señalización celular ([6142], [6430]). El proceso de peroxidación lipídica se inicia con la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo

metileno tras la interacción de PUFA con un radical. Se produce entonces una cadena de reacciones en las que finalmente se genera el radical peroxil lipídico, que es capaz de propagar la peroxidación lipídica disociando un hidrógeno del ácido graso adyacente para dar lugar a un hidroperóxido lipídico y un segundo radical lipídico ([5812], [6448]) (Figura 8). En presencia de metales, principalmente hierro y cobre, los hidroperóxidos se convierten en mutagénicos ([6478]). La peroxidación lipídica tiene dos grandes consecuencias: daño estructural de membranas y generación de radicales libres como productos secundarios. Todas las membranas celulares son especialmente vulnerables a la oxidación debido a su alto contenido en ácidos grasos polinsaturados. Como consecuencia se producen cambios en sus propiedades fisiológicas incluyendo ruptura de la membrana o alteraciones de la actividad de las proteínas unidas a membrana ([5419], [6421]). Si bien, todos los ácidos grasos pueden ser oxidados (enzimática), no todos pueden sufrir la cadena de reacciones que componen la peroxidación lipídica (no enzimática), siendo los PUFA los más susceptibles.



**Figura 8. Ejemplos de productos finales de la peroxidación lipídica a partir de hidroperóxidos lipídicos.** HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; HHE: 4-hidroxi-2-hexenal; MDA: malondialdehído.

La peroxidación lipídica a menudo ocurre como respuesta al estrés oxidativo, generando una gran diversidad de aldehídos a partir de la rotura de hidroperóxidos lipídicos (Figura 8) ([6421]). Algunos de estos aldehídos son altamente reactivos y pueden ser considerados como segundos mensajeros tóxicos, los cuales aumentan los efectos iniciales de los radicales libres. Los aldehídos, en comparación con los radicales libres, son relativamente estables y pueden difundir o incluso escapar de la célula y atacar dianas lejos del punto original. Pueden reaccionar con proteínas, ADN y fosfolípidos. A bajas concentraciones, estos

aldehídos pueden implicarse en diferentes funciones celulares como transducción de señales, expresión génica y proliferación celular ([6430]).

Entre los aldehídos, productos de la peroxidación lipídica, se hallan el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). La producción de MDA y su interacción con el ADN para formar aductos mutagénicos supone una fuente endógena importante de daño genómico y mutaciones que contribuyen en enfermedades genéticas. Algunos autores opinan que MDA es el aldehído más mutagénico y carcinogénico de la peroxidación lipídica, mientras que otros afirman que HNE es el producto más tóxico, siendo una de sus principales dianas es la mitocondria donde inactiva de forma selectiva proteínas que contienen un grupo tiol. Además, HNE puede causar la producción de ROS y activar vías como la de las MAPKinasas ([6459], [6479], [6480], [6614]).

Todos los productos de la peroxidación lipídica pueden unirse al ADN y formar aductos exocíclicos y pre-mutagénicos. Estos aductos son moléculas aromáticas planas que pueden dar lugar a sustituciones de pares de bases, siendo  $G \rightarrow T$  y  $A \rightarrow C$  las más frecuentes ([6521]).

Las lipoxigenasas (LOX) componen una familia de enzimas que llevan a cabo la peroxidación lipídica enzimática oxigenando PUFAs libres y esterificados dando lugar al correspondiente derivado hidroperóxido. Entre las diferentes LOX, la isoforma 12/15-LOX es la única capaz de oxidar compuestos lipídicos, como fosfolípidos y ésteres de colesterol, unidos a membrana o lipoproteínas. La enzima PHGPx podría considerarse la enzima antagonista por ser la única capaz de reducir los hidroperóxidos lipídicos unidos a membrana a sus correspondientes alcoholes ([6142]), véase el punto 3.3 de este subapartado) (Figura 8). Realmente, la primera defensa celular enzimática contra la peroxidación lipídica es el ciclo redox del Glutatión del cual forma parte dicha peroxidasa.

El papel de la peroxidación lipídica es controvertido. Por ejemplo, comparados con los ácidos grasos n-6, los n-3 parecen ejercer un efecto negativo sobre el crecimiento celular que puede, al menos en parte, ser explicado por la formación de productos de la oxidación, que conducen a la célula a la parada del crecimiento y, como son citotóxicos, a la apoptosis ([3185], [3421], [4324], [4546]). Por otra parte, al CLA se le atribuye la propiedad de suprimir la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, lo que evitaría el daño oxidativo ([2949], [3339], [3443]). El aceite de oliva es el que preserva mejor las estructuras celulares del daño oxidativo o genera menores niveles intracelulares. Esto es debido tanto a su elevado contenido en ácido oleico con menor susceptibilidad a la oxidación, como a sus componentes minoritarios ( $\alpha$ -tocoferol o

vitamina E, y los compuestos fenólicos como la oleuropeína, hidroxitirosol y lignanos), que son capaces de reducir la peroxidación lipídica, reduciendo el estrés oxidativo ([4904], [5372], [6061], [6069], [6080], [6611], [6613]). En relación a su posible papel en la iniciación del cáncer, los compuestos fenólicos hidrosolubles parecen tener un papel protector. Además, la riqueza antioxidante de estos compuestos contribuyen a la mayor estabilidad (período de conservación) de este aceite, que es notable en relación al cáncer ya que el nivel de compuestos oxidados potencialmente carcinogénicos es menor ([3018], [3229], [4743], [4802], [4883]).

La reacción de productos secundarios reactivos formados durante la peroxidación lipídica de la membrana, como el MDA o HNE, con grupos aminos de fosfolípidos y proteínas da lugar a la formación de un pigmento denominado lipofuscina en el interior de los lisosomas, el cual se va acumulando durante el envejecimiento ya que no puede ser degradado ni exocitado ([6524], [6551]). La formación de lipofuscina se acompaña de alteraciones en la estructura de la membrana e inactivación de las enzimas. En este sentido, la lipofuscina podría ser un indicador de la peroxidación de lípidos en tejidos ([6524]). El uso de lipofuscina como biomarcador celular del estrés oxidativo parece ser más apropiado que el uso de MDA o ácido tiobarbitúrico (TBA) que, al ser metabolitos tóxicos reactivos, normalmente son rápidamente degradados. Sin embargo, la lipofuscina representa el punto final del proceso de peroxidación lipídica y su acumulación es fácilmente detectable ([6552]).

Otros productos de la oxidación química, y metabólicamente estables, como son los isoprostanos (IsoPs) son utilizados como biomarcadores de la peroxidación lipídica *in vivo* ([6556]). Los IsoPs se generan a partir de la peroxidación no enzimática inducida por radicales libres del ácido araquidónico. Inicialmente, son formados en fosfolípidos y posteriormente liberados en su forma libre por las fosfolipasas ([6571]). La fosfolipasa tipo 2 (PLA2) es una enzima clave en la reparación de los ácidos grasos peroxidados, mediante la escisión de dichos compuestos, que serán reemplazados por nuevos ácidos grasos ([6618]).

Los F<sub>2</sub>-IsoPs son la clase de isoprostanos más abundantes y se forman por la reducción de endoperoxidos ([6557], [6559]). Se detectan en su forma esterificada en todos los tejidos biológicos normales y en lipoproteínas plasmáticas, y en su forma libre, en todos los fluidos biológicos normales indicando niveles “fisiológicos” del estrés oxidativo. Las concentraciones F<sub>2</sub>-IsoP en plasma pueden conferir un índice de la producción endógena de isoprostanos puesto que los niveles plasmáticos derivan de todos los tejidos del cuerpo. En enfermedades crónicas, la ratio de formación y eliminación de isoprostanos en circulación suele alcanzar valores relativamente fijos ([6556], [6559]).

### **3.5.3. Daño Oxidativo en Proteínas.**

Las proteínas pueden sufrir oxidación reversible, normalmente en cisteínas, lo cual produce consecuencias estructurales, conformacionales y catalíticas en la proteína diana. Este tipo de modificación constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox. La glutatiónilación y S-nitrosilación son modificaciones reversibles que pueden sufrir las proteínas y son revertidas por donadores tiol como el glutatión, la glutaredoxina y la TRx. Las proteínas también pueden sufrir modificaciones irreversibles por oxidación, estas se asocian normalmente con la pérdida permanente de la función y pueden producir la eliminación o acumulación de dichas proteínas dañadas ([6450], [6467]). En condiciones de estrés oxidativo, la glutatiónilación confiere protección a las proteínas con un grupo tiol de la oxidación irreversible. Una vez restablecido el medio redox intracelular, las proteínas recuperan su función con normalidad ([6435], [6436], [6468], [6470]).

Uno de los tipos de modificaciones irreversibles es la formación de grupos carbonilos. El nivel de dichos grupos en las proteínas es utilizado como marcador del daño oxidativo proteico por ser un producto con una estructura químicamente estable ([6465]). La acumulación de proteínas oxidadas puede ser un reflejo de la formación de radicales libres, el nivel de antioxidantes, y la capacidad de las proteasas para eliminar dichas proteínas oxidadas. El nivel de proteínas oxidadas incrementa con la edad y en determinadas enfermedades como en el caso del Alzheimer ([6474]). Se han realizado estudios en mujeres con cáncer de mama donde el nivel de proteínas carboniladas en plasma aumentaba durante la progresión del cáncer, presentando niveles significativamente superiores respecto a mujeres sanas ([6529], [6537]).

### **3.6. Estrés Oxidativo y Mecanismos de la Carcinogénesis.**

Tal y como se ha comentado anteriormente, el daño en el ADN, proteínas y lípidos inducido por ROS juega un papel muy importante en el desarrollo y la progresión de numerosos procesos patológicos incluido el cáncer. En caso de daño oxidativo en el material genómico, este puede resultar en una parada o estimulación del proceso de replicación, en inducción de vías de transducción de señales, errores en la replicación o en inestabilidad genómica. Todas estas situaciones están asociadas con carcinogénesis ([6196]).

Los radicales libres y diferentes productos de la peroxidación lipídica pueden causar lesiones premutagénicas en el material genético de la célula. Estas lesiones pueden ser reparadas o fijarse como mutaciones en el ADN colaborando así a la transformación de una célula sana en las etapas iniciales del cáncer. Un ejemplo son los aductos formados por el aldehído MDA, o la base modificada 8-oxo-dG, producto inespecífico de la oxidación. La fase de promoción es un proceso todavía reversible ya que se necesita de la continua presencia de un estímulo promotor del tumor, como bien podrían ser los radicales libres ([6446]). La progresión del cáncer, que implica el paso desde un estado preneoplásico a un estado neoplásico, se caracteriza por ser irreversible y acumular daño genómico. Aquí, los radicales libres pueden tener un papel en la transducción de señales, así como en la capacidad invasiva y metastásica del tumor ([6434]).

Alteraciones en las enzimas antioxidantes (SOD, Catalasa, GPx) y en antioxidantes no enzimáticos (GSH, vitamina C, TRx), así como en vías de señalización relacionadas, son comunes en muchos tipos de cáncer humano ([5812]). En general, se ha descrito una disminución de la capacidad antioxidante en las células tumorales respecto al tejido sano, aunque existen discrepancias entre los numerosos estudios realizados ([6095], [6440]). Algunos autores han observado una correlación entre un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes con un peor pronóstico del cáncer, sugiriendo que dicho incremento protege a la célula de ser dañada por radicales libres y favorece la proliferación celular. Por el contrario, una disminución de la capacidad antioxidante de la célula podría favorecer la formación de lesiones en el ADN, lo que le conferiría a la célula tumoral un fenotipo más agresivo y, por tanto, un peor pronóstico ([5845], [6456]).

La muerte celular es potencialmente un mecanismo de protección contra los carcinógenos exógenos y los estados inflamatorios que es regulado, en parte, por el estado redox de la célula. En este sentido, el cáncer se caracteriza por presentar un medio celular muy reducido. En cambio, un estado redox elevado podría incluso inducir la apoptosis, la cual podría inhibir la formación de tumores eliminando células parcialmente transformadas ([6077], [6144]).

El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica juegan un papel importante en la carcinogénesis mediada por la nutrición. El estado redox de la célula puede ser modificado por el tipo de dieta. De hecho, la mayoría de antioxidantes no enzimáticos se adquieren a través de la dieta, como por ejemplo las vitaminas C y E. Además, los polifenoles del té negro, la fibra, pero sobretudo los diferentes tipos de ácidos grasos ingeridos tienen efectos sobre el estado redox de la célula ([3339], [6141]). Estos últimos son los que se encuentran más claramente relacionados con el cáncer en general, y con el cáncer de mama, en particular ([4904], [5373], [6193]).

#### 4. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Es bien conocido que los ácidos grasos pueden regular la transcripción y procesamiento del ARN, así como la estabilidad y/o abundancia de proteínas de genes implicados en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Asimismo, aumentan las evidencias de su implicación en la regulación de una gran cantidad de genes relacionados con otras muchas funciones biológicas como son el crecimiento y diferenciación celular, supervivencia y apoptosis ([4541]). El efecto de los ácidos grasos sobre la expresión génica puede ser debido, al menos en parte, a los cambios en las membranas celulares y las vías de señalización nucleares. Por otro lado, también pueden controlar la transcripción génica de una forma más directa, rápida y aguda. Los ácidos grasos o sus metabolitos pueden controlar la actividad de los factores de transcripción mediante la unión, y posterior activación, a varios receptores nucleares, incluyendo la familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), el receptor X hepático (LXR) tipo  $\alpha$ , el del ácido retinoico (RXR) tipo  $\alpha$  y el receptor nuclear hepático 4 (HNF-4) tipo  $\alpha$ . Igualmente, los ácidos grasos pueden actuar alterando la actividad o la abundancia nuclear de muchos factores de transcripción sin necesidad de unirse a ellos, como es el caso de NF $\kappa$ B, SREBP (“sterol-regulatory element-binding proteína”), c/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein B) y el factor inducible por hipoxia (HIF) tipo 1 $\alpha$  ([4541], [4543]).

Existen datos en la literatura que asocian los ácidos grasos PUFA, especialmente los n-3, con la regulación de la expresión de los genes implicados en la transformación neoplásica, mientras que se conoce poco de la influencia de los MUFA y el aceite de oliva. Así, por ejemplo, el grupo investigador ha demostrado que el efecto diferencial de dos tipos de dieta hiperlipídica en cáncer de mama inducido con DMBA puede estar relacionado con cambios de expresión de genes implicados en la diferenciación celular. Por ejemplo, el gen PCPH, cuyo producto actúa de forma sinérgica con Ras y muestra una asociación entre su expresión y el grado de diferenciación de la glándula mamaria, disminuye su expresión por efecto de una dieta hiperlipídica PUFA n-6 ([4811], [5321]). Por otro lado, la ingesta de dieta hiperlipídica de aceite de maíz, pero no la de aceite de oliva virgen extra, aumenta los niveles de ARNm de  $\beta$ -Actina y del transportador ZBP1, sugiriendo una desregulación del transporte y la traducción de  $\beta$ -Actina asociada a un fenotipo tumoral más maligno en los animales alimentados con dicha dieta de aceite de maíz ([5965]). Por otro lado, los lípidos de la dieta pueden también modificar la expresión o la actividad de las enzimas implicadas en la producción de eicosanoides. El efecto promotor de las dietas ricas en PUFA n-6 en

carcinogénesis mamaria y de colon, se ha asociado a la sobreexpresión de los genes ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. Por el contrario, las dietas hiperlipídicas de PUFA n-3 ejercerían un efecto antitumoral a través de la inhibición de la expresión de COX-2 ([3616], [4324], [4546], [6793]).

La expresión de varias proteínas que controlan la proliferación celular, incluyendo algunos oncogenes y genes supresores de tumores, también está regulada por los ácidos grasos directa o indirectamente. Así, estudios en cultivo de células de cáncer de mama humano muestran una disminución de la expresión del gen de ErbB2/Neu por efecto del ácido oleico ([5149]). Otros resultados experimentales muestran una disminución de la expresión del oncogen c-myc y de c-Ha-ras en tumores mamarios de ratón alimentados con dietas con elevado contenido en aceite de pescado, mientras que una dieta rica en ácido linoleico aumenta la expresión de c-myc en glándula mamaria normal y en tumores benignos de ratas inducidas con PhIP ([1854], [2984]). En células humanas de cáncer de próstata, el ácido araquidónico (AA) tiene un efecto estimulador del crecimiento celular que se ha asociado a la expresión de ARNm de c-fos y COX-2 ([5041]). Por otra parte, en estudios *in vitro* con células mamarias, se ha descrito que la adición de ácido linoleico (LA) estimula la síntesis de ADN y disminuye los niveles de la proteína p53, mientras que el ácido docosahexanoico (DHA) induce la supresión de la proliferación celular y estimula la expresión de p53 ([2272], [3012]). En cáncer de colon se ha observado una menor actividad de p53 por efecto de una dieta al 10% en aceite de maíz como resultado de una sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL, y una desregulación de Bak ([4902]).

También existen datos sobre la influencia de los lípidos en la expresión de BRCA1 y BRCA2, involucrados en el desarrollo normal de la glándula mamaria y en el cáncer de mama espontáneo y, principalmente, hereditario. Así, la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 tratada conjuntamente con ácido linoleico y estradiol muestra una disminución en la expresión del ARNm de BRCA1 ([3857]). Por otra parte, en las líneas tumorales mamarias MCF-7 y MDA-MB231 un tratamiento con PUFA n-3 (EPA y DHA) aumenta la expresión de los ARNm de BRCA1 y BRCA2, mientras que los PUFA n-6 (ácido araquidónico -AA-) no modificarían dicha expresión ([4325]).

Recientemente, se ha observado que los ácidos grasos también podrían ejercer una influencia sobre la expresión de otras proteínas nucleares. Así, se ha descrito que los PUFA n-3 y otros ácidos grasos podrían modular la expresión de una serie de proteínas, conocidas como “Polycomb”, modificadoras de las histonas a nivel postraduccional y que controlan cambios en

la conformación de la cromatina. La sobreexpresión de una de ellas, EZH2, ha sido asociada a varias patologías incluyendo el cáncer de mama. La administración de los ácidos grasos DHA y EPA disminuiría la expresión de EZH2, lo cual se ha asociado a una inducción de E-caherina y IGFBP-3, y a una reducción del fenotipo invasivo en células tumorales mamarias ([7152]). En este sentido, determinados ácidos grasos podrían ejercer acciones epigenéticas mediante la remodelación de la estructura de la cromatina, lo cual puede resultar en cambios en la expresión de genes que no están necesariamente relacionados ([7375]).

Los ácidos grasos de la dieta también han sido descritos como inductores de los cambios de expresión de genes involucrados en angiogénesis, invasión y metástasis. Así, en distintos tipos de líneas celulares (pulmón, colon, mama e hígado) GLA, pero no LA o AA, ha sido relacionado con un aumento de la expresión de la molécula de adhesión E-cadherina, y esto a su vez, se ha correlacionado *in vitro* con una reducción de la invasividad y un incremento de la agregación celular ([4401]). GLA, además, aumenta la expresión de Maspina, lo cual se asocia a una disminución de la motilidad de las células tumorales, mientras que LA disminuye los niveles de Maspina ([3983]). Por otro lado, el potencial anti-angiogénico de EPA y DHA se ha relacionado con la inhibición de la producción de importantes moléculas mediadoras de la cascada angiogénica como son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el derivado de plaquetas (PDGF), el de fibroblasto (FGF), COX-2, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF $\alpha$ ), metaloproteasas de matriz (MMPs) y  $\beta$ -Catenina ([7151]).

En cuanto a los efectos inespecíficos de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama experimental, relacionados con el aporte energético, han sido asociados por el equipo investigador con la influencia que pueden ejercer dichas dietas en la regulación de la expresión de genes hepáticos como la carnitina palmitoil transferasa tipo 1 (CPT-1) y la sintasa HMG-CoA, los cuales están implicados en el metabolismo lipídico. Los resultados obtenidos, junto con los cambios observados en el perfil lipídico y, el peso y masa corporal, sugieren que el cáncer modifica la regulación de dichos genes, así como la expresión de PPAR $\alpha$ , mediante los lípidos de la dieta ([4737]).

Por otro lado, existen pocos trabajos en la literatura que hayan determinado el efecto de los lípidos de la dieta en el perfil de expresión génica en células tumorales. El equipo investigador, utilizando la tecnología de *Microarrays*, ha identificado 4 genes expresados diferencialmente en cáncer de mama experimental por efecto de una dieta rica en PUFA n-6:  $\alpha$ -2u globulina submaxilar, VDUP1 (“vitamin D3-upregulated protein 1”), el gen improntado

H19 y un gen de función desconocida que codifica la secuencia de expresión (EST) Rn. 32385. La regulación a la baja de estos genes en los tumores de los animales alimentados con dicha dieta se asoció con su malignidad clínica y anatomopatológica. Sin embargo, la expresión de estos genes no se modificó por la dieta de aceite de oliva virgen ([4735]). En relación a H19, además, el factor de crecimiento insulínico (IGF) II, que está influenciado por H19, aumentó su expresión por efecto de dicha dieta PUFA n-6, mientras que la dieta hiperlipídica de MUFA n-9 ejerció el efecto contrario. En otros trabajos, se ha observado que el tratamiento con LA en células de cáncer de mama T47D induce cambios en la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la transcripción del ARN ([4542]). Asimismo, se ha descrito que por efecto de los PUFA n-3, DHA y EPA, se modifica la expresión de genes implicados en funciones celulares tales como apoptosis, interacción huésped-patógeno, señalización y comunicación celular, transducción de señales y metabolismo ([7154]). En este sentido, el perfil de expresión en líneas celulares de cáncer de mama en respuesta a un tratamiento con EPA y AA está afectado por el estado de los receptores de estrógenos ([7150]). Otros autores, también han descrito un efecto de los lípidos de la dieta en el perfil de expresión génica de otros tumores. En un modelo experimental de cáncer de próstata se ha demostrado, mediante *Microarrays*, que una dieta hiperlipídica altera la expresión de genes implicados en inflamación, en el metabolismo de ácidos grasos y glucosa, en el metabolismo de andrógenos y en la actividad de proteínas kinasas, así como de moléculas de la matriz intra- y extracelular, factores de crecimiento y genes de respuesta a andrógenos ([4895]). Davidson *et al* han descrito cambios específicos en el perfil de expresión génica por efecto de ácidos grasos PUFA n-3 en un modelo en cáncer de colon, que ejercerían un efecto protector en la iniciación y promoción de dicho cáncer ([7149]). Por último, y en relación a la influencia del aceite de oliva, existe un único trabajo en epitelio mamario normal que ha mostrado el impacto de distintas dietas sobre la expresión génica en células epiteliales de glándula mamaria de rata antes y durante la pubertad. Las dietas empleadas contenían ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados n-6. El análisis mediante *Microarrays* mostró alteraciones en la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, incluyendo algunos implicados en la activación del ciclo celular o el *checkpoint* entre la fase G2 y M. Sin embargo, todas las dietas presentaron el mismo patrón de expresión al compararlas con la dieta control ([6319]).

## **F. OBJETIVOS.**

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación que desarrolla el “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” sobre “Lípidos de la Dieta y Càncer de Mama”. La investigación se ha realizado utilizando como soporte experimental el modelo de tumores mamarios inducidos en ratas hembra Sprague-Dawley con DMBA.

Los objetivos son los siguientes:

### **1. Estudiar el efecto de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz (rica en PUFA n-6) y de aceite de oliva virgen extra (rica en MUFA n-9 y componentes bioactivos) administradas desde el destete o desde la inducción con el carcinógeno sobre el crecimiento y la maduración sexual de los animales.**

1.1. Analizar la evolución ponderal y la masa corporal, así como la expresión hepática de genes del metabolismo lipídico (PPAR $\alpha$ , CPT-1a, L-FABP y UCP-2).

1.2. Evaluar la influencia de las dietas experimentales sobre el inicio de la pubertad a nivel clínico (apertura vaginal), morfológico (función ovárica y actividad endometrial) y molecular (expresión hipotalámica de Kisspeptina, GPR54, y ObR, y niveles plasmáticos de Leptina), así como el estado hormonal (niveles plasmáticos de LH, FSH, estradiol y progesterona, y expresión de los receptores esteroideos -RE $\alpha$ , RE $\beta$ 1, RE $\beta$ 2 y RP- en glándula mamaria).

1.3. Estudiar el estado de diferenciación de la glándula mamaria a nivel morfológico (número de estructuras epiteliales y densidad) y molecular (expresión de  $\beta$ -Caseína), así como la expresión de hormonas y receptores relacionados con los lípidos y el desarrollo glandular (Leptina y su receptor, Adiponectina y PPAR $\gamma$ ).

### **2. Analizar el efecto modulador de estos lípidos administrados en distintas etapas del desarrollo sobre la carcinogénesis mamaria inducida experimentalmente.**

2.1. Caracterizar morfológicamente los tumores experimentales mediante un análisis histopatológico, adaptado específicamente a las características de dichos tumores.

## Objetivos

- 2.2. Caracterizar clínicamente la carcinogénesis mamaria experimental mediante el análisis de parámetros clínicos: tiempo de latencia, incidencia y contenido y volumen tumorales.
- 2.3. Estudiar las microestructuras proliferativas anómalas (H, PIDL1, PIDL2 y T) en la glándula mamaria.
- 2.4. Analizar el estado receptor hormonal mediante el análisis de la expresión de los receptores esteroideos (RE $\alpha$ , RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2 y RP) en adenocarcinomas mamarios.
- 2.5. Investigar la posible influencia de dichas dietas sobre la expresión de hormonas y receptores relacionados con lípidos y el proceso carcinogénico (Leptina y su receptor, Adiponectina y PPAR $\gamma$ ) en adenocarcinomas mamarios.

### **3. Determinar mecanismos a través de los cuales las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de aceite de oliva virgen extra podrían ejercer su efecto modulador sobre la carcinogénesis mamaria experimental, en función del período de exposición.**

- 3.1. Investigar el estado de estrés oxidativo en glándula y adenocarcinomas mamarios a través del análisis de la capacidad antioxidante enzimática y no enzimática, la peroxidación lipídica y el daño en el ADN.
- 3.2. Identificar nuevos genes implicados en la carcinogénesis mamaria, y que hayan sido influenciados por tales dietas, a través de un cribaje mediante ADNc *Microarrays*.

El objetivo último de estos estudios es el de proporcionar evidencias experimentales sobre las acciones moduladoras de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama. Aunque es preciso ser prudente a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en modelos experimentales al cáncer humano, tales evidencias permitirían formular opiniones científicas acerca de la importancia que los hábitos dietéticos pueden tener en relación a la salud de la población o el riesgo de enfermedad. Asimismo, estos estudios ayudarían a definir factores de riesgo y/o protectores a los que puede estar sometida la población a partir de sus hábitos alimenticios en cuanto al consumo de grasas y componentes antioxidantes. En consecuencia, este trabajo en su conjunto podría enmarcarse en el campo de la prevención secundaria, e incluso primaria, del cáncer de mama.



INTRODUCCIÓN  
**MATERIAL & MÉTODOS**  
RESULTADOS  
DISCUSIÓN  
CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA



## **A. ENSAYOS BIOLÓGICOS.**

Este trabajo se soporta experimentalmente en el modelo de cáncer de mama inducido en la rata Sprague-Dawley mediante el carcinógeno químico 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno (DMBA). El diseño experimental se realizó con el objetivo de analizar los efectos de las dietas con alto contenido en MUFA n-9 o PUFA n-6 sobre las diferentes etapas de la carcinogénesis mamaria. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH 566/3616).

### **1. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES.**

El estudio se realizó con ratas hembra Sprague Dawley (Charles River Lab.; cepa CrI:OFA(SD), L'Arbresle Cedex, Francia). Al inicio del ensayo los animales tenían 23 días de edad y su peso corporal medio era de 50.9 g. En este momento los animales fueron destetados y alimentados *ad libitum* con agua corriente y la correspondiente dieta experimental. Los animales se mantuvieron en un estabulario convencional con condiciones de barrera, filtración de aire y presión positiva. Permanecieron a una temperatura de  $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , al 50% de humedad y con un ritmo diario de 12 horas de luz artificial (8:00 a 20:00 horas) y 12 horas de oscuridad. Se distribuyeron 2 ó 3 animales por caja de  $1000\text{ cm}^2$  de superficie basal.

El cuidado de los animales y el establecimiento cumplían las normas del Real Decreto 1201/2005 y la legislación Autonómica, el Decreto 214/1997, sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

### **2. DIETAS EXPERIMENTALES.**

En este trabajo se utilizaron tres dietas semisintéticas con la misma composición cualitativa pero distinto contenido lipídico: dieta normolipídica m3, dieta hiperlipídica de aceite de maíz M20 (rica en ácido linoleico -18:2n-6-) y dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra mO20 (rica en ácido oleico -18:1n-9- y componentes bioactivos). Todas ellas fueron diseñadas y preparadas en el laboratorio donde se realizó este trabajo y su idoneidad para este ensayo fue anteriormente estudiada ([2567], [2568], [4303]). Este aspecto es de gran relevancia dado que la dieta constituye la variable experimental más importante de los estudios sobre la influencia de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental. Para poder asegurar que los resultados obtenidos se deben específicamente a las variaciones de la

dieta es imprescindible que ésta sea equilibrada para la rata y que no contenga sustancias que afecten la carcinogénesis mamaria. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 1, y en la Tabla 2 se indica la composición de los aceites utilizados. Los componentes empleados y el material necesario para su preparación se describen a continuación. Las dietas fueron preparadas en tandas de 4 Kg, y a lo largo de todo el ensayo se elaboró un total de 684 Kg de dieta.

#### COMPONENTES:

##### - Lípidos:

- Aceite refinado de germen de maíz (ver composición en la Tabla 2).
- Aceite de oliva virgen extra (ver composición en la Tabla 2).

El análisis de la composición de los aceites se llevó a cabo en el Instituto de la Grasa de Sevilla (IGS).

##### - Proteínas: Caseína láctica (J. Escuder S.L).

##### - Carbohidratos: Dextrosa (J. Escuder S.L.).

##### - Fibra: Celulosa comestible microcristalina -AVICEL PH 102- (J. Escuder S.L).

##### - Vitaminas (J. Escuder S.L.):

- Liposolubles: DL- $\alpha$ -tocoferol acetato (E), retinol acetato (A), fitomenadiona (K<sub>1</sub>), colecalciferol (D3).

- Hidrosolubles: Bitartrato de colina, inositol, ácido ascórbico (C), ácido nicotínico, pantotenato cálcico, aneurina (B1), riboflavina (B2), clorhidrato de piridoxina (B6), ácido fólico, biotina, cobalamina (B12).

##### - Minerales (J. Escuder S.L.): Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>), fosfato monocálcico (CaHPO<sub>4</sub>), sulfato magnésico monohidratado (MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), cloruro sódico (NaCl), citrato ferroso amoniacal (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>FeNH<sub>4</sub>), sulfato de manganeso monohidratado (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), cloruro de zinc (ZnCl), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), yoduro potásico (KI).

#### MATERIAL:

- Balanza de precisión Sartorius-Werke GMBH (minerales y vitaminas).
- Balanza Sartorius Universal -precisión centésimas- (ingredientes dietas).
- Batidora semiindustrial Kenwood A901 (mezcla de ingredientes minoritarios).
- Batidora industrial Vímar 15/351 (mezcla final).
- Otros: material de pesada, espátulas, recipientes de plástico con cierre hermético, bolsas de plástico, aparato doméstico de vacío y soldado.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta).

	m3	M20	mO20
<b>PROTEÍNAS</b>			
Caseína	18.0	23.0	23.0
<b>CARBOHIDRATOS</b>			
Dextrosa	67.9	45.9	45.9
<b>LÍPIDOS</b>			
Aceite	3g aceite de maíz	20g aceite de maíz	3g aceite de maíz 17g aceite de oliva virgen extra
<b>FIBRA</b>			
Celulosa	5	5	5
<b>SALES</b>			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6100000		
CaCO <sub>3</sub>	1.2322576		
CaHPO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	1.0630714		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0000000		
NaCl	0.8350000		
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> FeNH <sub>4</sub>	0.1130148		
MnSO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	0.0255000		
ZnCl	0.0072964		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0039294		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0002500		
KI	0.0000641		
TOTAL SALES	5.8903837	5.8903837	5.8903837
<b>VITAMINAS</b>			
E	0.0227273		
A	0.0014000		
K	0.0001000		
D3	0.0000031		
Colina	0.1800000		
Inositol	0.0150000		
C	0.0075000		
Ácido nicotínico	0.0060000		
Pantotenato	0.0040000		
B1	0.0010000		
B2	0.0010000		
B6	0.0010000		
Ácido fólico	0.0005000		
Biotina	0.0001000		
B12	0.0000050		
TOTAL VITAMINAS	0.2403354	0.2403354	0.2403354

Tabla 2. Composición del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados.

PARÁMETRO (unidad)	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
<b>Acidez libre (% en ácido oleico)</b>	0.32	0.30
<b>Índice peróxidos (meqO<sub>2</sub>peroxidico/Kg)</b>	12	9
<b>COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%)</b>		
C16:0 (palmítico)	11.1	13.2
C16:1 (palmitoleico)	0.2	1.3
C17:0 (margarico)	0.1	0.1
C17:1 (margaroleico)	-	0.2
C18:0 (esteárico)	2.3	2.5
C18:1 trans (elaídico)	0.1	-
C18:1 (oleico)	31.7	73.7
C18:2 trans (isómeros linoléicos)	1.3	-
C18:2 (linoleico)	51.3	7.3
C18:3 trans (isómeros linolénicos)	0.3	-
C18:3 (linolénico)	0.5	0.8
C20:0 (araquidónico)	0.5	0.4
C20:1 (eicosenoico)	0.2	0.3
C22:0 (behénico)	0.2	0.1
C24:0 (lignocérico)	0.2	0.1
<b>COMPOSICIÓN ESTERÓLICA (respecto al total de esteroides)</b>		
Esteroides totales (mg/Kg)	7758	1639
Colesterol (%)	0.2	0.1
Brassicasterol (%)	-	-
24-metilen colesterol (%)	1.2	0.2
Campesterol (%)	16.5	2.6
Campestanol (%)	1.6	0.1
Estigmasterol (%)	6.0	0.8
Delta-7-campesterol (%)	0.2	-
Clerosterol (%)	0.8	1.3
Beta-sitosterol (%)	62.6	88.2
Sitostanol (%)	4.3	0.7
Delta-5-avenasterol (%)	4.0	5.0
Delta-5,24-estigmastadienol (%)	0.5	0.5
Delta-7-estigmastenol (%)	1.1	0.3
Delta-7-avenasterol (%)	1.0	0.2
<b>ALCOHOLES (mg/Kg)</b>		
Alcoholes grasos alifáticos	176	663
Alcoholes triterpénicos	3919	9164
Eritrodíol (dialcohol triterpénico)	12	20
<b>TOCOFEROLES (mg/Kg)</b>		
Alfa-tocoferol	380	232
Beta-tocoferol	12	4
Gamma-tocoferol	1201	28
Delta-tocoferol	45	-
Alfa-tocotrienol	116	-
Gamma-tocotrienol	38	-

Tabla 2. Continuación.

PARÁMETRO (unidad)	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
<b>HIDROCARBUROS (mg/Kg)</b>		
Hidrocarburos esteroideos	940	-
Escualeno	485	5745
<b>PIGMENTOS CLOROFÍLICOS</b>		
Feofitinas (mg/Kg)	-	16.1
<b>CAROTENOS (mg/Kg)</b>		
Beta-caroteno (mayoritario)	1.2	7.0
<b>COMPUESTOS FENÓLICOS (mg/Kg)</b>		
Hidroxitirosol (HTy)	-	17.0
Tirosol (Ty)	-	11.8
Ácido vanílico	-	0.4
Vanillina	-	0.2
Ácido p-cumárico	-	0.4
Ácido ferúlico	-	1.6
Acetato hidroxitirosilo	-	6.9
Acetato tirosilo	-	3.7
Forma dialdehídico del aglucón de la decarboximetil-oleuropeína (derivado del HTy)	-	37.6
Forma dialdehídica del aglucón del decarboximetil-ligustrósido (derivado del Ty)	-	33.2
Forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína (derivado del HTy)	-	38.2
<b>LIGNANOS (mg/Kg)</b>		
Pinoresinol	-	3.1
Acetoxipinoresinol	-	8.0
<b>FLAVONAS (mg/Kg)</b>		
Luteolina	-	10.0
Apigenina	-	4.3
<b>RESUMEN ÁCIDOS GRASOS (%)</b>		
Saturados	14.4	16.4
MUFA	32.1	75.5
PUFA n-6	51.3	7.3
PUFA n-3	0.5	0.8
Isómeros trans	1.7	-

### 3. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS.

#### MATERIAL:

- Carcinógeno: DMBA (7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno ó 9,10-dimetil-1,2-benz-antraceno ó 1,4-dimetil-2,3-benzfenantreno) (Sigma-Aldrich Química, S.A.).
- Diluyente: Aceite de maíz (0,91908 g/ml).
- Otros: baño “Unitronic-320” (JP Selecta S.A.), agitador “Vibromatic-384” (JP Selecta S.A.), sondas, jeringuillas.

La inducción carcinogénica se realizó según el método de Huggins *et al* ([439], [443]) modificado ([1299]). Este método provoca la aparición de tumores mamarios en la rata de características similares a los humanos ([1438], [4264]). El DMBA se disolvió en aceite de maíz a una concentración final de 5 mg/ml. Esta disolución se realizó en un baño a +40°C en agitación constante durante 24 horas y protegiendo el carcinógeno de la luz. Los procedimientos utilizados siguieron estrictamente normas GLP (“Good Laboratory Practices”).

El carcinógeno se administró a los animales a los 53 días de edad. Se suministró una única dosis de DMBA mediante instilación buco-gástrica con una sonda conectada en su extremo proximal a una jeringuilla de 1 ml. La dosis única de carcinógeno fue de 5 mg de DMBA/animal correspondiente a 1 ml de la solución de aceite.

### 4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El estudio estuvo integrado por 167 animales. El día posterior a su llegada, 6 animales fueron sacrificados (tal y como se detalla más adelante) y el resto fueron distribuidos en 5 grupos experimentales: los grupos Control (C), M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> de 29 animales cada uno y los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> formados por 37 animales cada uno. En todos los grupos, los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, el día 22-23 de vida. A partir de ese día y hasta el final del ensayo se les administraron las distintas dietas experimentales, m3, M20 o mO20. Tal como se muestra en la Figura 9, los animales del grupo control -C- recibieron dieta normolipídica durante todo el ensayo, mientras que los animales de los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> recibieron dieta M20 y mO20, respectivamente. Estos dos grupos fueron diseñados para estudiar los efectos del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra, sobre la iniciación y la promoción de la carcinogénesis mamaria. Los animales de los grupos M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> fueron alimentados con dieta m3 desde el destete hasta la inducción con el carcinógeno

(día 53 de edad), y a partir de este día con dieta M20 y dieta mO20, respectivamente. Estos grupos se diseñaron para estudiar los efectos de las dietas de aceite de maíz y aceite de oliva virgen extra sobre la etapa de promoción del cáncer de mama.

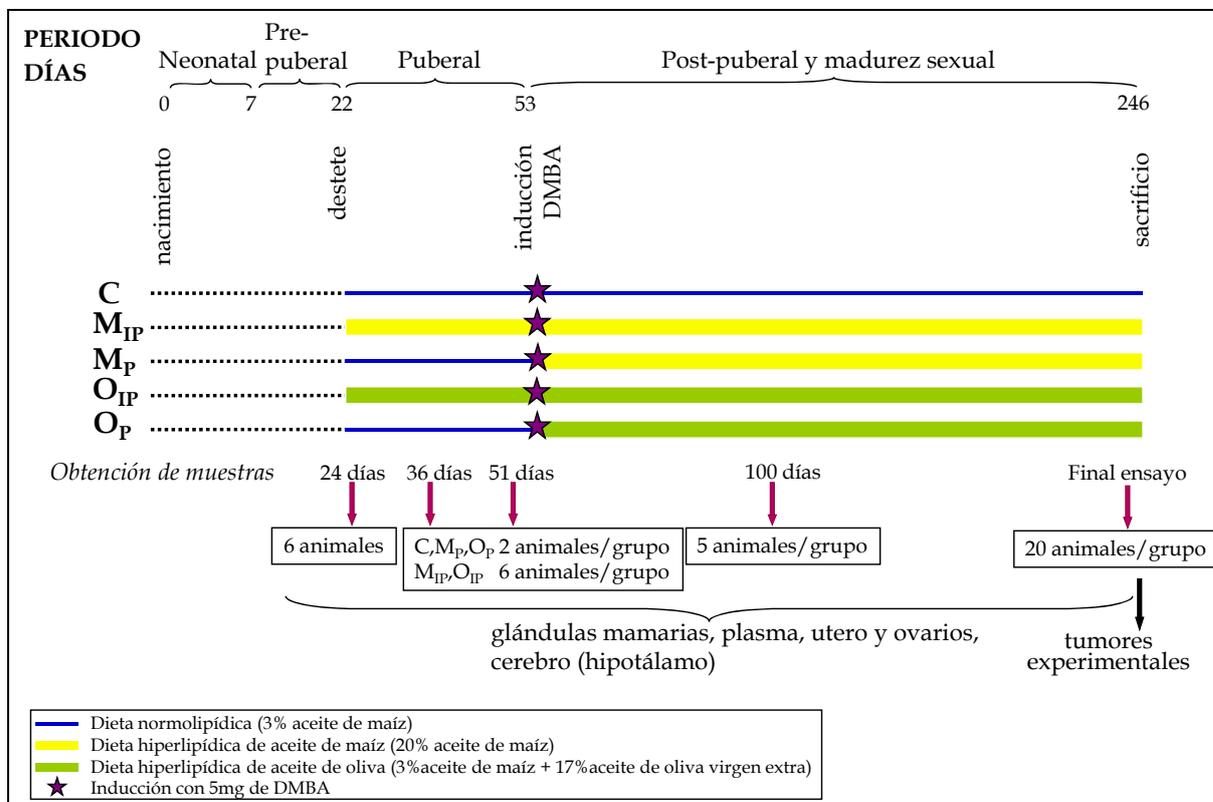


Figura 9. Diseño experimental.

Todos los animales fueron inducidos el día 53 -día 0 del tiempo post-inducción- con una dosis única de 5 mg de DMBA. Como el carcinógeno se administró vehiculizado en un lípido, a fin de evitar problemas de absorción, los animales de los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> recibieron dieta normolipídica durante dos días antes y un día después de la inducción. Por el mismo motivo, a los animales de los grupos M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> no se les administraron las dietas hiperlipídicas hasta el día después de la inducción (día 54).

A partir del destete, los animales fueron pesados e inspeccionados semanalmente (tal y como se detallará en el siguiente subapartado de este capítulo).

En los días 24, 36, 51, 100 y 246 (edad media al final del estudio) se sacrificó a los animales. Debido a que a los 24 días aún no había diferencias entre los animales, se procesaron 6 con independencia de los grupos experimentales. A los 36 y 51 días de edad se sacrificaron 2 animales de los grupos C, M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> ya que tenían las mismas condiciones

experimentales (dieta normolipídica), y 6 animales de los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub>. A la edad de 100 días, se procesaron 5 animales de cada grupo y el final del estudio coincidió con el procesamiento del resto de los animales (20 por grupo).

Previamente a cada sacrificio se obtuvo el peso y la longitud naso-anal de cada rata. Además, se determinó la fase del ciclo estral mediante citología vaginal a los 100 y 246 días de edad. En esta última, se seleccionaron aquellos animales que se encontraban en diestro. Únicamente los dos últimos días del período de eutanasia del final del estudio se sacrificaron animales que no estaban en dicha fase, a fin de no alargar este período. Además, no se sacrificó más de una rata por caja y día para evitar el estrés generado por la denominada “sensación inminente de peligro” que se produce en el resto de los animales de la misma caja ([1310], [6864]).

Con el fin de respetar el ritmo circadiano de algunas hormonas, el sacrificio se realizó entre las 10:00 y las 13:00 horas, tras dejar a los animales en su hábitat normal durante un mínimo de 1 hora 30 minutos desde su manipulación. Inmediatamente después del sacrificio de cada animal, se procedió a la necropsia y la obtención de las diferentes muestras biológicas: sangre total, glándula mamaria, útero, ovarios, cerebro y vísceras, así como los tumores experimentales a los 100 días y al final del estudio.

## **5. EXPLORACIONES PERIÓDICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA.**

### **MATERIAL:**

- Balanza “Sartorius MC1” (Laboratory LC6200).
- Centrífuga “Centrosix Tabletop Centrifuge” (JP Selecta S.A.).
- Éter etílico, caja de anestesia.
- Formol al 4% y al 10%.
- Guillotina, tijeras, bolsas de plástico cónicas con extremo distal abierto.
- Herramientas de disección.
- Microscopio “Laborlux 11” (Leitz).
- Suero fisiológico (ClNa 0.9%).
- Tampón fosfato salino (PBS -NaCl 0.137 mM, KCl 2.689 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 9.996 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.763 mM, pH 7.4-).
- Tubos de heparina-litio, tubos siliconizados.
- Otros: algodón, embudos, gradillas, espátulas de algodón, portaobjetos, cubreobjetos, recipientes de cristal, pipetas Pasteur, etc.

Tal como ya se ha mencionado, los animales fueron explorados semanalmente mediante inspección, palpación y determinación del peso corporal. Estas exploraciones permitieron: 1) el estudio de la evolución ponderal, 2) la detección, localización y determinación de los dos diámetros mayores de los nódulos tumorales, 3) efectuar el control de la calidad de la serie, investigando la posible presencia de otras patologías, generales ([855], [1387], [1390]) o por desequilibrios nutricionales ([827], [905], [5742]).

Para el estudio del crecimiento y la maduración de los animales se analizó la evolución ponderal a lo largo de todo el ensayo. En el momento del sacrificio se estudió la masa corporal de los animales utilizando el Índice de Lee, específico para rata [ $\{(\text{peso corporal -g})^{1/3} / (\text{longitud naso-anal -mm-})\} \times 10000$ ] ([839]), y el Índice de Masa Corporal ( $\text{peso -g-} / \text{longitud -cm}^2$ ). Además, entre los días 30 y 52, los animales fueron explorados diariamente para determinar el día de apertura vaginal como indicador del inicio del ciclo estral, por lo tanto de la maduración sexual y del inicio de la pubertad. De esta manera se observaron los cambios morfológicos de la zona vaginal previos a la apertura. Dichos cambios fueron categorizados en distintas fases siguiendo el criterio del Servei Experimentació Animal del Parc Científic de Barcelona (Dr. X. Cañas). En la Tabla 3 se detallan las características de cada una de las categorías y en la Figura XX se muestran imágenes representativas.

**Taula 3. Categorización de la apertura vaginal.**

<b>Categoría</b>	<b>Características</b>
0	Vagina totalmente cerrada. Zona perivaginal sin relieve considerable
1	Vagina cerrada. Zona perivaginal con relieve
2	Pliegues perivaginales marcados. En ocasiones puede observarse un pequeño orificio vaginal.
3	Orificio vaginal claramente definido. Labios bien marcados y separados.

A partir del día de apertura vaginal (primer día de valor 3) y hasta el día 52 de edad, se determinó diariamente la fase del ciclo estral por citología vaginal. Se recogieron las células mediante un bastoncillo de algodón empapado en suero fisiológico. Las células se extendieron sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se procedió a la observación microscópica categorizando las distintas fases del ciclo estral siguiendo criterios previamente descritos ([4033], [5987]).



Figura 10. Imágenes representativas de la categorización de la apertura vaginal.

Por otro lado, las palpaciones comenzaron el día 74 de edad de los animales (21 post-inducción). Éstas se realizaron de forma sistemática a fin de determinar la aparición, localización y el contenido tumoral. Asimismo se midieron los dos diámetros mayores de cada tumor mediante un nonius para calcular el crecimiento tumoral a través del volumen estimado. Dichas palpaciones se realizaron sobre el animal colocado en posición anatómica normal, situado frente al operador y con la cabeza por delante. El animal se sujetaba suavemente con las dos manos y, simultáneamente, se le palpaban las zonas laterales longitudinales desde la base del cuello hasta la zona inguinal y alrededores de la cola. Además, se realizaba la misma operación a lo largo de la zona central y de ambos lados del cuello. El método de palpación consistió, básicamente, en pinzar los nódulos, a través de la piel, con el pulgar y el índice y, posteriormente, presionar a lo largo del cuerpo con el dedo plano a fin de descubrir las pequeñas irregularidades (Figura 11A).

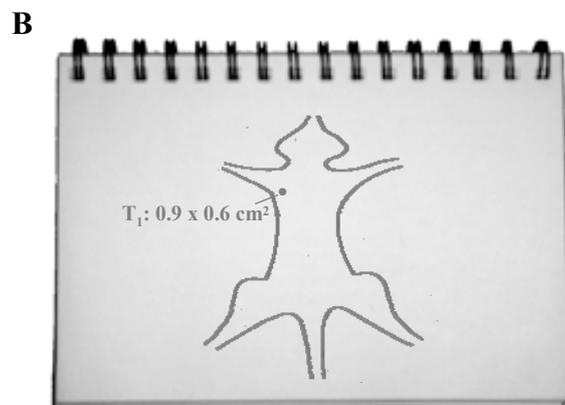


Figura 11. Exploraciones periódicas de los animales. (A) Imagen representativa de la palpación de una rata. (B) Esquema utilizado para la transcripción de los resultados de la exploración.

Los nódulos encontrados en cada exploración se emplazaron en un esquema corporal para cada una de las ratas (Figura 11B).

Al final del ensayo, todos los animales restantes fueron sacrificados. A fin de obtener muestras en condiciones homogéneas y conseguir la mínima interferencia de hormonas endógenas, los animales se sacrificaron en la misma fase del ciclo estral. La fase seleccionada fue el diestro debido a sus características: mayor duración ([855], [5987]), facilidad para su identificación diagnóstica, estado hormonal ([840], [1023]) y los efectos conocidos de las dietas hiperlipídicas sobre su duración y estado hormonal ([918], [945], [1046]). La determinación de la fase estral se realizó mediante citología vaginal tal y como ya se ha comentado anteriormente. A fin de no alargar demasiado el tiempo de sacrificio, en los dos últimos días fue necesario procesar animales en otras fases del ciclo.

Los animales fueron sacrificados por decapitación troncular. En la proximidad de la zona de trabajo se dispuso también de un sistema de anestesia con éter etílico para cubrir posibles eventualidades, que no fue necesario utilizar. El método de decapitación troncular con guillotina fue escogido por considerarse uno de los más *humanitarios* para matar a los animales y el más eficaz ([6864]). Además, está exento de los problemas que tiene la anestesia con éter, tanto para el tipo de estudio (principalmente los relacionados con la posible influencia sobre parámetros hormonales -[922], [935], [6864]-), como para los animales (estrés por asfixia e irritación de membranas y mucosas). El animal seleccionado era introducido en el interior de una bolsa cónica cuyo extremo distal estaba abierto para que pudiese respirar. Así se inmovilizaba el animal, actuando con mayor rapidez y reduciendo el grado de estrés. Tras el sacrificio, se procedía a la limpieza exhaustiva de todo el material y a la ventilación de la sala antes de continuar con el siguiente animal ([6864]). El horario del sacrificio, la edad de los animales y la selección y el número de animales sacrificados por caja y día ya han sido indicados en el subapartado anterior. Durante la necropsia se realizó, con la máxima rapidez posible, la obtención de sangre total. Se separaron 200-300  $\mu$ l para el ensayo Comet, que fueron guardados a +4°C, y el resto se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma de los elementos formes. Ambas fases se almacenaron a -20°C. En el caso de los sacrificios a 100 y 246 días, se procedió, paralelamente, a la exéresis de los tumores. De cada uno de ellos se determinaron los 3 diámetros mayores y se separó una parte representativa que fue fijada en formol al 4% para su posterior estudio anatomopatológico. El resto de la muestra tumoral se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó posteriormente a -80°C.

## Material & Métodos

En relación a las glándulas mamarias, se realizó la exéresis de las abdominales y torácicas del lado izquierdo. Se separó un fragmento de ~100 µg que se sumergió en PBS y almacenó a +4°C para realizar el ensayo Comet. El resto se congeló en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C. Estas glándulas se destinaron a estudios de biología molecular. Por otro lado, las contralaterales (derechas) fueron fijadas en formol al 4% o al 10% según la técnica a realizar posteriormente, inmunohistoquímica o *Whole Mount*, respectivamente. Finalmente se procedió al eviscerado del animal. Para estudios histológicos, se separó un fragmento del hígado y se fijó en formol al 10%, y los úteros y ovarios fueron fijados en formol al 4% hasta su procesamiento. El cerebro y el resto de vísceras se lavaron en suero fisiológico y rápidamente se congelaron en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C. La necropsia completa de los animales se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la guía de Rowet ([566]).

### **B. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS Y MORFOLÓGICOS.**

#### MATERIAL:

- Lupa binocular (Olympus).
- Microscopio óptico Axio scope A.1 ( Zeiss) con cámara AxioCam ICci (Zeiss).
- Microscopio óptico Nikon Eclipse E800.
- Set de tinción (Diapath).
- Programas de análisis: ACT-1 para DXM 1200F versión 2.51 (Nikon), analySIS® (“Soft Imaging System for Windows”), AxioVision Rel 4.7 (Zeiss) e ImageJ 1.42. (disponible en la red).
- Otros: vitrina de gases, agitador, estufa, nevera a +4°C, baño, olla a presión, portaobjetos, cubreobjetos, placas de petri, material de disección.

El material fungible utilizado y las soluciones específicas de las diferentes técnicas se detallan en los correspondientes apartados.

### **1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES.**

El estudio histopatológico se realizó en colaboración con un médico especialista en anatomía patológica. Las muestras se fijaron en formol al 4%, y se incluyeron en parafina. Se

practicaron varios cortes de cada muestra (de 1 a 3) de 4 µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina. El diagnóstico de las biopsias tumorales se basó esencialmente en los criterios de Young y Hallowes ([1141]). Por otra parte, se analizó el grado arquitectural y nuclear de los adenocarcinomas y el número de mitosis en 10 campos de gran aumento (400X) para valorar el grado histológico basado en el método de Scarff-Bloom-Richardson, utilizado en los carcinomas de mama humanos, adaptado a la rata por el equipo investigador ([4264]).

## **2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA GLÁNDULA MAMARIA (WHOLE MOUNT).**

La caracterización morfológica de la glándula mamaria se realizó mediante el análisis de preparaciones completas (*Whole Mount*) ([6656]). Se utilizaron las glándulas mamarias derechas de 3 animales a los 24, 36, 51 y 100 días y de 7-8 por grupo al final del ensayo. Las glándulas, aún adheridas a la piel, fueron fijadas en formol al 10% de 6 a 48 horas según la edad de los animales. Se separaron las glándulas de la piel y se incubaron con acetona para eliminar el tejido adiposo (incubación en agitación entre 2-4 y 48 horas según las edades). A continuación, se procedió a eliminar los restos de acetona mediante etanol al 70% e hidratar las glándulas en agua destilada para proseguir con la tinción con una solución de carmín de aluminio (carmín 2 g/l, sulfato de aluminio y potasio -AlKSO<sub>4</sub>- 5 g/l). Posteriormente, se deshidrataron en una serie de alcoholes de graduación creciente (etanol 35, 50, 70, 95 y 100%) y finalmente, las glándulas fueron sumergidas en una solución limpiadora (Histochoice, Sigma-Aldrich Química, S.A.). Tras eliminar parte del tejido conjuntivo y muscular bajo una lupa binocular, se realizó el montaje de las glándulas en medio Clarion (Sigma-Aldrich Química, S.A.).

La determinación del número de estructuras epiteliales normales: TEB, TD y AB y lóbulos tipo 1, 2 y 3 se realizó en 10-15 campos (1 campo 400X  $\equiv$  3.77 mm<sup>2</sup>) por glándula mamaria. Las estructuras se contaron en el margen externo de la glándula, que es el área con mayor actividad de crecimiento, y se identificaron siguiendo los criterios previamente establecidos por Russo y Russo ([3122]) mediante un microscopio óptico de campo claro (Nikon) acoplado a un sistema de captación de imagen y al programa de análisis ACT-1® (Nikon). A fin de comprobar la identificación correcta de los TEB y TD, se midió el diámetro de dichas estructuras mediante el programa AnalySIS® (Olympus), considerándose TEB las de diámetro superior a 100 µm, y TD las de diámetro inferior ([5970]).

Además, se determinó el número de estructuras proliferativas anómalas: hiperplasias (H), proliferaciones intra-ductolobulillares (PIDL) tipo 1 y 2, siendo estas últimas las de mayor tamaño, y tumores (T). Estas estructuras fueron identificadas según el criterio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Parc Taulí (comunicación personal). El estudio morfológico de la glándula mamaria inducida se realizó en base a la clasificación de sus estructuras realizada entre varios miembros del grupo investigador y la especialista en patología mamaria.

Por otro lado, se llevó a cabo una categorización cualitativa de las glándulas mamarias distribuyéndolas en 7 categorías de menor a mayor grado de densidad. A su vez, estas categorías se agruparon en cuatro clases con el fin de facilitar el análisis estadístico cualitativo: clase I (categorías 1 y 1.5), clase II (categorías 2 y 2.5), clase III (categorías 3 y 3.5) y clase IV (categoría 4). La clasificación de las glándulas mamarias se realizó bajo el microscopio por dos investigadores independientes.

### **3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA FUNCIÓN OVÀRICA Y ENDOMETRIO.**

El estudio de la función ovàrica y del endometrio se realizó en colaboración con un médico especialista en anatomía patológica. Las muestras se fijaron en formol al 4%, y se incluyeron en parafina. Se practicaron varios cortes de cada muestra (de 1 a 3) de 5 µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Se determinó bajo microscopio óptico la presencia en los ovarios de cuerpos lúteos, cuerpos lúteos en regresión y folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y atrésicos. Por otro lado, se clasificó el estado del endometrio según era inactivo, proliferativo o secretor.

### **4. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS NIVELES DE LIPOFUSCINA EN HÍGADO.**

Este análisis se realizó a partir de muestras de hígado incluidas en bloques de parafina tras ser fijadas en formol al 10%. Los ensayos se realizaron a partir de secciones de 4µm de grosor.

Para determinar la presencia de lipofuscina en células del hígado se utilizó la tinción de Schmorl, que es específica de determinados pigmentos de características reductoras como la melatonina. La señal positiva resultante se encuentra, típicamente, en el interior de las células de von Kupffer. Este tipo de tinción utiliza dos agentes colorantes: la tianina amoniacal y el ácido pícrico saturado ([6525]).

Los criterios utilizados para valorar cada una de las muestras de hígado ensayadas se basaron en la abundancia de pigmentos teñidos en el interior de las células de von Kupffer. La escala que se empleó fue de 0 a 5, donde el 0 representó una ausencia de reacción positiva y el 5 la máxima positividad.

## **5. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES RE $\alpha$ Y RE $\beta$ .**

Los ensayos se realizaron a partir de secciones de 4  $\mu$ m de grosor procedentes de muestras de adenocarcinoma mamario y glándula mamaria. Se utilizó el kit “Vectastain® ABC Elite” (Vector Laboratories, Inc.) basado en el sistema de detección Avidina/Biotina.

Las secciones histológicas fueron desparafinadas con xilol e hidratadas mediante concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100, 95, 70 y 50%) y PBS. A continuación se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico con un tampón de citrato sódico a pH 6.0 (Vector Laboratories, Inc.) a +100°C. Una vez atemperadas las muestras, se realizaron una serie de lavados con agua destilada y PBS. El área de las secciones fue delimitada con un marcador (Dakopen DakoCytomation). El bloqueo de las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario se realizó con suero normal de caballo (NHS) al 5% (RE $\alpha$ ) o 10% (RE $\beta$ ) (Vector Laboratories, Inc.) durante 20 minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de suero con tres lavados en PBS y se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas de la biotina endógena siguiendo las instrucciones del fabricante de “Avidin/Biotin Blocking kit” (Vector Laboratories, Inc.). Posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario a +4°C durante toda la noche y en el interior de la cámara húmeda. Después de realizar 3 lavados con PBS, las secciones se incubaron con la solución del anticuerpo secundario biotinilado correspondiente diluido en NHS durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en el interior de la cámara húmeda. A continuación, se realizaron lavados con PBS y se incubaron con el sustrato de la peroxidasa 3,3'-Diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories, Inc.) durante 5 minutos. Para la contratinción se utilizó Hematoxilina QS (Vector Laboratories, Inc.). Finalmente, las muestras fueron sumergidas en agua y deshidratadas mediante concentraciones crecientes de alcohol etílico (50, 70, 95 y 100%) y xilol. Inmediatamente después, las muestras fueron montadas con medio DPX Mounting (WWR BD Prolabor). Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 4.

Se consideraron positivas aquellas células con el núcleo teñido de color marrón, claramente diferenciable. En el caso de la glándula mamaria, la identificación de dichas células

se realizó en las distintas estructuras epiteliales por separado. Cada una de las estructuras fue identificada en campos de 200X y cuantificada en 8 campos de 400X, en 1 sección por muestra, y se expresó como el porcentaje de células positivas respecto al total de células.

Previamente al análisis de las muestras, se estandarizó el método de cuantificación empleando las muestras de un estudio de la proteína Ki67 realizado anteriormente en el grupo investigador. Se cuantificaron los 8 campos de 400X mediante un sistema manual, utilizando el programa AxioVision Rel. 4.7, y un sistema semiautomático, utilizando el programa ImageJ 1.42. En ambos sistemas había que determinar la positividad de cada célula, pero a diferencia del manual, el método semiautomático cuantificó directamente el número total de células positivas y negativas. La similitud de resultados empleando ambos sistemas validó el método semiautomático, que fue el utilizado para el resto de estudios.

**Tabla 4. Anticuerpos utilizados en el estudio de los niveles de proteína mediante inmunohistoquímica.**

<b>Nombre</b>	<b>Huésped</b>	<b>Ref.</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>
anti-RE- $\alpha$	Ratón	ab2746	Abcam	1/100
anti-RE- $\beta$	Conejo	ab3577	Abcam	1/500
anti-conejo IgG (H+L)	Cabra	BA-1000	Vector Laboratories Inc.	1/200
anti-ratón IgM	Cabra	BA-2020	Vector Laboratories Inc.	1/200

Ref.: Referencia.

### **C. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

#### MATERIAL:

- Autoclave “SterilClav-75 Dry” (Raypa).
- Cabina de Flujo Laminar Vertical “FLV60” (EURO AIRE - Tecnología para Diagnóstico e Investigación s.a.).
- Centrífuga 5415R (Eppendorf).
- Centrífuga refrigerada “Sorvall<sup>®</sup> RC-6” (DuPont Instruments).
- Equipo de calibración de pH “GLP 21” (Crison).
- Equipo de homogenización de tejidos “Polytron” (Kinematica).
- Equipo de *Real Time*-PCR MyiQ5-iCycle (Bio-rad Laboratories).
- Espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo scientific).

- Espectrofotómetro “Ultrospec 1000” (Pharmacia Biotech).
- Fuente de alimentación electroforética: “Power Supply 200/2” (BioRad).
- Horno de hibridación (Ecogen).
- Lector de placas “Labsystem Multiskan MS” (Labsystem).
- Microcentrifuga “Microfuga™ 11” (Beckman).
- Programas de análisis de imagen: Quantity One™ (BioRad)
- Sistema de captura de imágenes en tiempo real “Gel Doc 2000” (BioRad).
- Termociclador “Techne” (Progene).
- Unidad de electroforesis “Mini-PROTEAN® 3 Cell” (BioRad).
- Unidad de transferencia electroforética “Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell”.
- Otro material: Congelador de -80°C “Ultima II” (REVCO), combinado de nevera de +4°C y congelador de -20°C (Liebherr), agitadores magnéticos y orbitales, vórtex, contenedores de nitrógeno líquido, máquina de hielo, estufas, balanzas de precisión, horno microondas, baños con control de temperatura, cubetas de electroforesis horizontales, bandejas, peines electroforesis.

El material fungible utilizado y las soluciones específicas de las diferentes técnicas bioquímicas y de biología molecular se detallan en los correspondientes apartados.

## **1. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE HORMONAS.**

Los niveles plasmáticos de LH y FSH fueron determinados por radioinmunoensayo de doble anticuerpo por el Dr. M. Tena-Sempere de la Universidad de Córdoba. El kit utilizado fue suministrado por el Dr. AF Parlow (National Institute of Health -USA-, NIDDK National Hormone and Peptide Program). La determinación de FSH y LH se realizó por duplicado en unos volúmenes de 25 y 50 µl, respectivamente, mediante el estudio de desplazamiento de un trazador por la hormona de la muestra. Como trazadores se utilizaron Rat LH-I-10 y Rat FSH-I-9 marcados con <sup>125</sup>I empleando tubos Iodo-gen®, según las instrucciones de la casa comercial (Pierce, Rockford, IL, USA). Las concentraciones fueron expresadas utilizando como referencia los estándares rat LH-RP-3 y rat FSH-RP-3. Los coeficientes intra-ensayo fueron de menos del 10% para ambas hormonas. La sensibilidad del ensayo fue de 5pg para LH y de 20pg para la FSH por tubo. Como controles externos se

utilizaron muestras de plasma de rata de concentración conocida. Se analizaron todas las muestras en el mismo ensayo para cada hormona.

Los niveles plasmáticos de estradiol y de progesterona se determinaron en el Servicio de Endocrinología de la Universitat Autònoma de Barcelona mediante los kits “Estradiol (E<sub>2</sub>) Concentration ELISA kit” y “Progesterone Concentration ELISA Quantitation kit” (GenWay Biotech, Inc.), respectivamente. El primer kit se basa en el principio de unión competitiva entre el estradiol de la muestra a analizar y una cantidad constante de estradiol conjugado a peroxidasa (E<sub>2</sub>-HRP). Así, el ensayo consistió en una incubación de 25 µl de plasma con 100 µl de reactivo E<sub>2</sub>-HRP y 50 µl del reactivo anti-Estradiol durante 90 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Tras una serie de lavados, se detectó el estradiol conjugado a peroxidasa con un colorante azul cuya absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a 450 nm.

El kit empleado para determinar los niveles de progesterona en plasma, al igual que el kit anterior, se basa en el principio de unión competitiva entre la progesterona de la muestra y la progesterona conjugada (Pg-HRP) a una cantidad constante de anticuerpo anti-progesterona. Para conocer los niveles de progesterona en plasma se llevó a cabo el procedimiento ya descrito para los de estradiol.

## **2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

### **2.1. Extracción de ADN total.**

Para la extracción de ADN genómico a partir de glándulas y adenocarcinomas mamarios se utilizó el kit “Speedtools Tissue DNA Extraction” (Biotools), basado en un sistema de unión del ADN a una membrana de partículas de sílica. Este sistema consistió en una pre-lisis de 25 mg de tejido en presencia de Proteinasa K y SDS a +56°C durante 17 horas y una lisis en una solución de hidrocloreuro de guanidina a +70°C durante 10 minutos. El ADN unido a la membrana de la columna se lavó y se recuperó por elución con una solución de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino (5mM Tris-HCl pH 8.5).

La cuantificación del ADN obtenido se realizó a partir de 2 µl de muestra utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). El rendimiento medio fue aproximadamente de 1 µg ADN/mg de tejido glandular mamario y de 3 µg ADN/mg de tejido tumoral mamario.

La integridad del ADN extraído se comprobó por electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó ADN Lambda HindIII (New England Biolabs, Inc.) como marcador de peso molecular. Los geles y muestras se prepararon según Sambrook *et al* ([2648]). Se utilizó TAE 1x (tris-acetato 0.8mM, EDTA 0.02mM) como tampón de electroforesis. La concentración de agarosa utilizada fue del 1%. Se prepararon minigeles de 7 x 10 cm y un grosor de 2-3 mm y se aplicó un voltaje de 60V durante 30 minutos. El ADN fue diluido en agua bidestilada estéril y se le añadió 1/6 parte del volumen de tampón de carga de ADN (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol). La visualización del ADN se consiguió por tinción con el agente intercalante bromuro de etidio que se incorporó directamente en el gel a una concentración final de 0.5 µg/ml. La imagen conseguida por transiluminación fue captada por el sistema Gel Doc 2000 (BioRad Laboratories) con iluminación del gel con luz ultravioleta y utilizando el programa Quantity One<sup>TM</sup> (BioRad Laboratories).

## **2.2. Extracción de ARN total.**

La manipulación de ARN requiere la adopción de una serie de precauciones a fin de evitar su degradación por la actividad de las ribonucleasas (RNasas), que podrían tener tanto un origen endógeno (de la propia muestra) como exógeno (contaminación por parte de los investigadores, de las soluciones y/o del material). Por ello se tomó especial precaución en conseguir y mantener un ambiente libre de RNasas (“RNasa-free”). Para esto:

- Se trabajó siempre con guantes y éstos fueron sustituidos frecuentemente.
- Los reactivos y el material para la manipulación del ARN fueron marcados y guardados por separado.
- El material metálico y de vidrio se trató con calor incubándolo a +200°C durante toda la noche (12-14 horas).
- Las superficies de trabajo y las pipetas automáticas utilizadas fueron tratadas con solución inhibidora de RNasas (“RNasa Away”-Molecular BioProducts-).

La extracción de ARN total a partir de muestras tumorales y de hígado, se realizó siguiendo el procedimiento del kit “RNeasy Tissue” (Qiagen) basado en la unión del ARN a una membrana de partículas de sílice en presencia de una elevada concentración de sales. Se pesaron 30 mg de tejido tumoral pulverizado en un tampón desnaturante que contenía β-mercaptoetanol y tiocianato de guanidina para inactivar las RNasas, asegurando así una buena purificación de ARN intacto. Se utilizó un “Polytrón” (Kinematica<sup>®</sup>) para la homogenización

del tejido. Tras una centrifugación de 3 minutos a máxima velocidad el ARN quedó en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas quedaron retenidos en la interfase y en la fase orgánica. El ARN se unió a una membrana de sílica y se lavó con diferentes soluciones provistas por el kit. Finalmente, se recuperó por elución con H<sub>2</sub>O libre de RNasas y fue almacenado a -80°C.

En el caso de la extracción de ARN total a partir de tejido glandular mamario e hipotalámico, se utilizó el kit “RNeasy Lipid Tissue” (Qiagen), indicado para tejidos con un elevado contenido lipídico. Este procedimiento utiliza una solución de lisis monofásica de fenol y tiocianato de guanidina diseñado para facilitar la lisis del tejido adiposo e inhibir RNasas. Se utilizaron 50 mg de tejido mamario pulverizado o el hipotálamo disecado. Se procedió a la extracción de ARN según se ha descrito anteriormente.

La integridad y la pureza del ARN extraído, así como su cuantificación, fueron determinadas por electroforesis capilar utilizando el sistema Agilent 2100Bioanalyzer (Agilent Technologies). En este trabajo, únicamente se utilizaron los ARN de óptima calidad, es decir, con valor de RIN (*RNA Integrity Number*) superior a 7 y una ratio 28S/26S próxima a 2.

### **3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA (*MICROARRAYS*).**

El estudio del perfil de expresión génica se realizó mediante el análisis de microarrays de exones en el Servicio de Microarrays de la Unitat Científicotècnica de Suport (UCTS) del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Se utilizó la plataforma GeneChip® Rat Exon 1.0 ST Array Affymetrix. Dichos “chips” contienen aproximadamente un millón de celdas de grupos de sondas (*probesets*) capaces de reconocer unos 850000 exones distintos. Cada *probeset* contiene por término medio cuatro sondas diferentes que reconocen el mismo exón. El estudio se realizó a partir de 6 muestras de adenocarcinomas mamarios y 3 de glándula mamaria.

Los ensayos se realizaron con 250-500 ng de ARN total de óptima calidad (RIN>8). Las muestras fueron marcadas utilizando el kit “One-Cycle Target Labeling and Control Reagent” (Affymetrix). A partir del ARN total, se sintetizó ADN complementario (ADNc) de doble cadena. Tras purificar dicho ADNc, se generó un ARN complementario (ARNc) marcado con biotina, que fue purificado y fragmentado. Este ARNc marcado fue inyectado en los “chips” de microarrays, que fueron incubados durante 16 horas en un horno de hibridación con eje rotatorio (Hybridization oven 640, Affymetrix). Los “chips” fueron

posteriormente lavados y teñidos con estreptavidina-ficoeritrina en la estación de fluidos “Fluids station 450” (Affymetrix). Finalmente se procedió al escaneado y procesamiento de las imágenes utilizando el escáner “GeneChip Scanner 3000 7G” (Affymetrix) con estación de trabajo y cargador automático de “chips”.

#### 4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (*Real Time-PCR*).

La PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa, es un método donde tiene lugar la amplificación y cuantificación del ADN de forma simultánea. Dicha técnica fue empleada para cuantificar el ARN mensajero a partir de las muestras de ADN complementario (ADNc), el cual se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total utilizando el sistema “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystem). Las muestras fueron incubadas con 10 µl de *RT mix* durante 10 minutos a +25°C, 120 minutos a +37°C y, finalmente, 5 segundos a +85°C. El ADNc resultante fue diluido a una concentración de 25 ng/µl y posteriormente almacenado a -20°C.

Previamente al análisis de la expresión, se realizaron las pruebas de eficiencia de amplificación de cada uno de los genes de estudio. Se eligieron muestras representativas y se diseñó una serie de diluciones 2x. A partir de los resultados se calculó la amplificación de ADN en cada ciclo, que ha de ser próxima al 100%, considerando que en la fase exponencial de la reacción cada ciclo, teóricamente, dobla la cantidad de producto. Con estos ensayos además de comprobar la amplificación eficiente, se estableció la concentración inicial de ADNc a analizar.

El análisis inicial de la expresión de kisspeptina (*kiss-1*) en hipotálamo se realizó por *Real Time-PCR* basada en SYBR Green como sustrato fluorescente, ya que en ese momento no había disponibles ensayos para dicho gen con la metodología TaqMan<sup>®</sup>. Se amplificaron 100 ng de ADNc utilizando una mezcla de reactivos iQ Supermix (BioRad Laboratories) en un volumen final de 25 µl y con una concentración de *primers* de 300 nM. Para cada muestra se analizó *kiss-1* y el gen de la proteína ribosomal S11 como transcrito control. Los *primers* (Bionova) utilizados fueron: *kiss-1* “sense”: TGGCACCTGTGGTGAACCCTGAAC; *kiss-1* “antisense”: ATCAGGCGACTGCGGGTGGCACAC; S11 “sense”: CATTGAGACGGAGC-GTGCTTAC; S11 “antisense”: TGCATCTTCATCTTCGTCAC ([5828]). La amplificación se realizó con el equipo MyiQ-iCycler (BioRad Laboratories) con el siguiente programa: 1

ciclo de +95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de +95°C durante 15 segundos, +62.5°C durante 30 segundos y +72°C durante 30 segundos. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (sin ADNc). Además se comprobó la especificidad de la amplificación analizando la pureza de los fragmentos generados mediante curvas de disociación y separación en geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

Para el análisis de expresión de otros genes en glándula mamaria, hipotálamo, hígado y en adenocarcinomas mamarios se utilizó la metodología TaqMan® (Applied Biosystem). Se amplificaron 25 ng de ADNc utilizando la mezcla de reactivos “TaqMan Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystem) y el ensayo TaqMan® apropiado en un volumen final de 25µl. Cada ensayo contiene los *primers* y una sonda marcada fluorescentemente, específica para el gen de estudio. Las características de cada ensayo TaqMan® utilizado se encuentran detalladas en la Tabla 5. Todas las muestras fueron amplificadas por duplicado en un equipo MyiQ-iCycler (BioRad Laboratories) con el siguiente programa: 1 ciclo de +95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de +95°C durante 15 segundos y +60°C durante 60 segundos. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (sin ADNc).

La cuantificación de los genes de interés de cada muestra se realizó durante la fase exponencial de amplificación. Así, se determinó un umbral en dicha fase exponencial y se obtuvo el número de ciclo en el cual la fluorescencia de cada muestra superó el valor umbral (Ct -“Cycle threshold”-). Los valores obtenidos para cada muestra se normalizaron en relación al transcrito control Hprt1. Para cada muestra se calculó la diferencia entre el Ct del gen problema y el del control ( $\Delta Ct$ ). Considerando que en cada ciclo de PCR se dobla el producto, el cálculo  $2^{-\Delta Ct}$  representó el número de veces que se expresó el gen problema respecto al gen control.

**Tabla 5. Ensayos TaqMan® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante Real Time-PCR.**

Símbolo del gen	Nombre del gen	Ref. TaqMan®
AdipoQ	Adiponectin	Rn00595250_m1
β- cas	β- casein	Rn01524626_m1
Cat	Catalase	Rn00560930_m1
Cdkn2b	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B	Rn00590746_m1
CPT-1a	Carnitine Palmitoyltransferase 1A	Rn00580702_m1
FABP3	Fatty Acid Binding Protein 3	Rn00577366_m1
L-FABP	Liver Fatty Acid Binding Protein	Rn00664587_m1
Fhl 1	Four and a Half LIM domains protein 1	Rn01402101_m1
Gja 1	Gap Junction α1	Rn01433957_m1

Tabla 5. Continuación.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Ref. TaqMan®
Gpx 1/GSHPx	Glutathione Peroxidase 1	Rn00577994_g1
Gpx 4/PHGpx	Glutathione Peroxidase 4	Rn00820816_g1
GSR	Glutathione -S- Reductase	Rn00588153_m1
IL18	Interleukin 18	Rn01422083_m1
JAK2	Janus Kinase 2	Rn00676341_m1
Kiss1	Kisspeptin	Rn00710914_m1
Kiss 1R	Kisspeptin Receptor	Rn00576940_m1
Lep	Leptin	Rn00565158_m1
Lep R	Leptin Receptor	Rn01433205_m1
Notch 4	Neurogenic locus notch homolog protein 4	Rn01525719_m1
PPAR $\alpha$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\alpha$	Rn00566193_m1
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$	Rn00440945_m1
RE $\alpha$	Estrogen Receptor $\alpha$	Rn00664737_m1
RE $\beta$ 1	Estrogen Receptor $\beta$ 1	Rn00688792_m1
RE $\beta$ 2	Estrogen Receptor $\beta$ 2	Rn01468728_m1
RP	Progesterone Receptor	Rn0057662_m1
Scd / Scd1 / Scd4	Stearoyl-CoA Desaturase	Rn00821391_g1
Smad 1	Mothers Against decapentaplegic homolog1	Rn00565555_m1
SOD 1/CuZnSOD	Superoxide Dismutase 1	Rn01477289_m1
SOD 2/MnSOD	Superoxide Dismutase 2	Rn99999088_g1
UCP-2	Mitochondrial Uncoupling Protein 2	Rn01754856_m1
Hprt	Hypoxanthine- Guanine Phosphoribosyl Transferase 1	Rn01527840_m1

Ref.: Referencia.

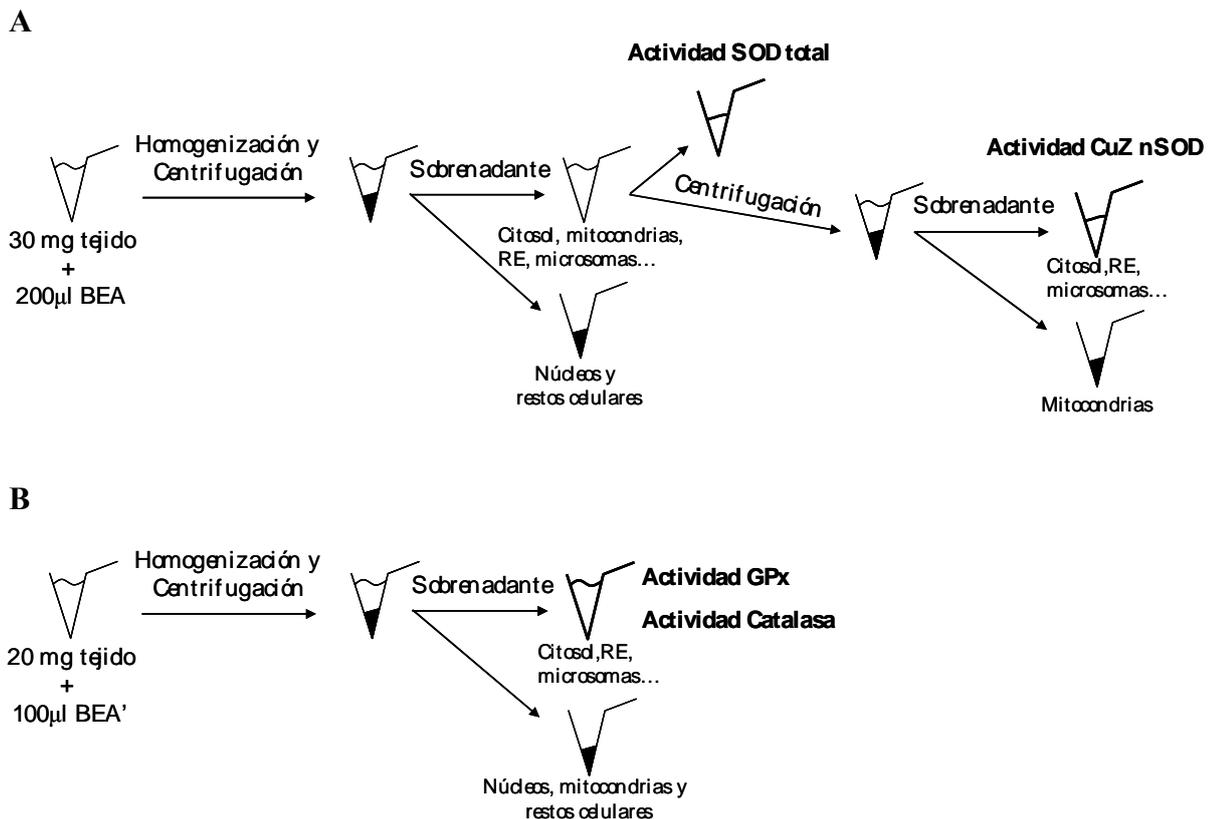
## 5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES.

A partir de una misma muestra se obtuvieron distintos tipos de extractos proteicos celulares para realizar los ensayos de actividad enzimática. Los dos protocolos utilizados se muestran en la Figura 12 y se detallan a continuación.

El primer protocolo de extracción se realizó a partir de 30 mg de glándula mamaria o de tejido tumoral mamario, previamente pulverizados, que se homogenizaron en 300  $\mu$ l (tumor) o 200  $\mu$ l (glándula mamaria) de tampón BEA o *Buffer of Enzymatic Activity* (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 250 mM sucrosa, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Para homogenizar el tejido se utilizó un “Polytron” con un vástago de 5 mm de diámetro a 26000 rpm durante 15 segundos. El lisado celular se centrifugó a 1500 g durante 5 minutos a +4°C para eliminar los núcleos, células no lisadas y restos de tejido. Del sobrenadante obtenido se separó una alícuota de ~100  $\mu$ l, y el resto se volvió a centrifugar a 10000 g durante 15

## Material & Métodos

minutos a +4°C obteniéndose, por un lado, un precipitado de mitocondrias y, por otro lado, un sobrenadante que se recuperó como fracción citosólica sin mitocondrias (Figura 12A). Finalmente, se determinó la concentración de proteínas de cada fracción (detallada más adelante) y se almacenaron a -80°C. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron a +4°C para preservar la integridad de las proteínas.



**Figura 12. Método de obtención de extractos proteicos celulares.** (A) Obtención de dos fracciones citosólicas diferentes con tampón BEA. (B) Obtención de una fracción citosólica con tampón BEA'.

En el segundo protocolo, 20 mg de glándula o adenocarcinomas mamarios pulverizados fueron homogenizados manualmente en 100 µl de buffer BEA' (BEA + 1 mM DL-Dithiothreitol (DTT)). El lisado celular resultante fue centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a +4°C. Se recuperó el sobrenadante como extracto citosólico y se procedió a la determinación de la concentración de proteínas (Figura 12B). Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron a +4°C para preservar la integridad de las proteínas.

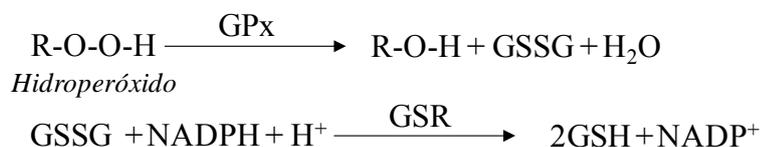
La cuantificación de proteínas en los extractos celulares obtenidos se realizó mediante el método de Lowry, utilizando el kit "DC Protein Assay II" (BioRad Laboratories). El procedimiento seguido requirió la dilución apropiada de las muestras en el tampón de



Para el cálculo de la actividad SOD total y actividad CuZnSOD se utilizó la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar. Los resultados se expresaron como unidad por miligramo de proteína (U/mg), siendo una unidad la cantidad de enzima necesaria para exhibir una dismutación del radical superóxido al 50%.

### 6.1.2. Glutación Peroxidasa (GPx).

El ensayo de actividad GPx se realizó con el kit “Glutathione Peroxidase Assay” (Cayman) a partir de los extractos proteicos obtenidos previamente (tal y como se ha detallado anteriormente). La determinación de la actividad de dicha enzima se realiza indirectamente a través de una reacción acoplada con Glutación-S-Reductasa (GSR). El Glutación oxidado, producido durante la reducción de hidroperóxidos por GPx, es reciclado a su estado reducido por la enzima GSR y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> va acompañada de un descenso de la absorbancia a 340 nm. Bajo condiciones en las cuales la actividad GPx se encuentra limitada, la velocidad de descenso de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad glutación peroxidasa en la muestra.



En cada ensayo se añadieron 2 controles positivos (GPx de eritrocito bovino) y 2 negativos (*background*). Las muestras se diluyeron a una concentración final de 1 µg/µl para obtener valores de actividad GPx entre 50-344 nmol/min/ml. Tras añadir 100 µl de tampón de ensayo, 50 µl de mezcla co-sustrato (NADPH, Glutación y GSR), 10 µl de muestra o control y 20 µl de hidroperóxido de cumeno, se realizó la lectura de la absorbancia a 340 nm en un lector de placas durante 5 minutos a intervalos de 1 minuto. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

El cálculo de la actividad GPx se obtuvo utilizando la velocidad de descenso de la absorbancia ( $\Delta\text{Abs}_{340}/\text{min}$ ) de cada muestra y el coeficiente de extinción de NADPH ( $0.00373 \mu\text{M}^{-1}$ ). Los resultados se expresaron como unidad por miligramo de proteína (U/mg), siendo una unidad la cantidad de enzima necesaria para extinguir 1 nmol de NADPH en 1 minuto en un volumen final de 1 ml.

### **6.1.3. Catalasa (CAT).**

El ensayo de actividad de la enzima Catalasa se llevó a cabo a partir de los mismos extractos obtenidos para el ensayo de actividad GPx.

La cuantificación de la actividad Catalasa se realizó mediante “Catalase Assay kit” (Cayman). Este método utiliza la función peroxidasa de Catalasa en la cual participan alcoholes de bajo peso molecular, en este caso el metanol, como donadores de electrones en presencia de una concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El formaldehído producido es medido colorimétricamente utilizando 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno.



En cada ensayo se introdujo una curva estándar compuesta por 7 puntos de formaldehído, de concentración conocida, y un control positivo con catalasa procedente de hígado bovino. Las muestras se diluyeron a una concentración final de 0.2 µg/µl para asegurar que la absorbancia se encontraba dentro del rango lineal de la curva estándar. Después de cargar 100 µl de tampón de ensayo, 30 µl de metanol, 20 µl de muestra, estándar o control, y 20 µl de peróxido de hidrógeno, se realizó una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Para frenar la reacción se utilizó hidróxido de potasio. A continuación se añadieron 30 µl de cromógeno Purpald y se incubó 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 10 µl de periodato potásico, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en agitación y se procedió a la lectura de la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. Tanto las muestras como los estándares y el control fueron ensayados por duplicado.

Los cálculos de la actividad de la enzima se realizaron a partir de la función de la curva estándar, creada con las absorbancias de los 7 estándares, para obtener la concentración de formaldehído generado por cada muestra. Los resultados se expresaron como unidad por miligramo de proteína (U/mg), donde una unidad se define como la cantidad necesaria de enzima catalasa para formar 1 nmol de formaldehído por minuto a +25°C.

## **6.2. Análisis de los Niveles de Glutati3n.**

Los niveles de GSH y GSSG de gl3ndula mamaria y adenocarcinomas fueron determinados en el Servicio de An3lisis Cl3nicos del Departamento de Bioqu3mica y Biolog3a molecular de la Universidad de Valencia.

### **6.2.1. Determinaci3n de GSH.**

Para determinar la cantidad de GSH se parti3 de 25 mg de tejido de gl3ndula y adenocarcinoma mamario. El tejido se homogeniz3 en un tamp3n de fosfato pot3sico 50 mM a pH 7.4 y posteriormente se centrifug3 a 10000 rpm durante 5 minutos a +4°C. Se recuper3 el sobrenadante, al cual se le a3adieron 20 µl de metacresol 10 mM y se ajust3 el pH con KOH 3M hasta alcanzar un pH de 10 en el que la muestra vir3 a un color violeta. A continuaci3n, se a3adieron a la muestra 300 µl de fluoronitrobenceno 1% (FDNB) y se incub3 durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, la muestra se conserv3 a +4°C hasta su procesamiento mediante “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC).

Previamente al an3lisis mediante HPLC, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a +4°C y el sobrenadante se transfiri3 a viales para HPLC. Para procesarlo se emplearon columnas “Spherisorb ODS S5 NH<sub>2</sub>” (5.2 x 250 mm) (Waters Cromatograf3a S.A.) y un flujo de 1 ml/min. Asimismo, se procesaron patrones de GSH de concentraciones conocidas, de 6.25 a 100 nmoles, para la construcci3n de una recta patr3n.

### **6.2.2. Determinaci3n de GSSG.**

El nivel de GSSG presente en las muestras se determin3 a partir de 25 mg de tejido procedente de gl3ndula y adenocarcinomas mamar3os. Tras homogenizar el tejido en tamp3n PCA GSSG 6%, el lisado celular se centrifug3 a 10000 rpm durante 5 minutos y a +4°C. El sobrenadante se trasvas3 a un nuevo tubo donde se le a3adieron 50 µl de colorante metacresol 10 mM y se ajust3 el pH a 10 con KOH 3M. A continuaci3n se a3adieron 300 µl de FDNB 1% a las muestras y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubaci3n, las muestras se dejaron desecar durante toda la noche en una estufa seca a +50°C. Al d3a siguiente, se resuspendieron con 300-400 µl de metanol al 80% y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos y a +4°C. El sobrenadante obtenido se transfiri3 a los viales mencionados anteriormente para la determinaci3n mediante HPLC.

Asimismo se utilizaron las mismas columnas y un flujo de 1 ml/min. Para la construcción de una recta patrón, se procesaron patrones de GSSG de concentraciones conocidas, de 50 a 3.125 nmoles, que se analizaron previamente a las muestras.

### 6.3. Análisis de los Niveles de F<sub>2</sub>-IsoP en Plasma.

Los niveles de F<sub>2</sub>-IsoP libres presentes en las muestras de plasma se determinaron en el Servicio de Análisis Clínicos del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Valencia. El estudio se realizó mediante un inmunoensayo empleando el kit “8-isoprostane EIA” (Cayman). Este ensayo está basado en la unión competitiva entre los F<sub>2</sub>-IsoP presentes en la muestra y un trazador (8-isoprostano-acetilcolinesterasa -“8-Isoprostano Tracer”-) a un antisuero de conejo específico de 8-IsoP.

Se incubó la muestra, el trazador y el serum anti 8-isoprostano durante 18 horas a +4°C. Posteriormente, los complejos resultantes se unieron a un anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo (“Rabbit IgG mouse monoclonal antibody”).

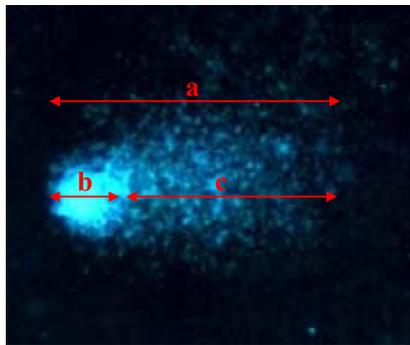
Debido a que la concentración de “8-Isoprostano Tracer” fue siempre constante, y que la concentración de F<sub>2</sub>-IsoP libre varió entre las diferentes muestras, la cantidad de “8-Isoprostano Tracer” que se unió al anticuerpo fue inversamente proporcional a la concentración de F<sub>2</sub>-IsoP de la muestra. Una vez eliminados los restos no unidos, se añadió reactivo Ellman’s que contenía el sustrato de la acetilcolinesterasa. El producto que resultó de la reacción enzimática dio lugar a un color amarillo cuya intensidad fue determinada en un espectrofotómetro a 412 nm. La intensidad del color fue proporcional a la cantidad de “8-Isoprostano Tracer” unido al pocillo e inversamente proporcional a la cantidad de F<sub>2</sub>-IsoP libre presente en la muestra.

En cada ensayo se añadieron dos blancos (para determinar la absorbancia *background* del reactivo Ellman’s), dos controles de unión inespecífica, es decir, unión no inmunológica del trazador, y dos controles de unión máxima del trazador con el anticuerpo, además de 8 estándares. Las muestras y los estándares también fueron analizados por duplicado. Con dichos puntos estándar se creó una regresión lineal a partir de la cual se determinó la concentración de F<sub>2</sub>-IsoP de cada muestra.

## 6.4. Detección del Nivel de Daño en el ADN.

### 6.4.1. Ensayo Comet.

El ensayo Comet, también conocido como “Single Cell Gell Electrophoresis” (SCGE), se basa en una electroforesis de células individuales en geles de agarosa. La técnica consiste en someter una suspensión celular a una lisis alcalina, a un tratamiento para desenrollar el ADN y, finalmente, a una migración electroforética de corta duración. El material genético no dañado migrará agrupado en forma esférica, mientras que los fragmentos de menor medida, producidos por roturas en el ADN, migrarán a una distancia superior dando lugar a una imagen parecida a la cola de un cometa (Figura 13).



**Figura 13. Imagen representativa del ensayo Comet.** a: ADN genómico de una célula; b: ADN no dañado o cabeza; c: fragmentos de ADN o cola .

En primer lugar, se preparó una primera capa de agarosa al 1% sobre un portaobjetos. Para ello se hirvieron los portaobjetos en 10 volúmenes de agua oxigenada y agua desionizada en una proporción 2:1 durante 1 hora. Tras dejar secar los portaobjetos al aire, estos fueron incubados en etanol 70% durante un mínimo de 1 hora. Una vez desengrasados, los portaobjetos se sumergieron en la agarosa caliente al 1% durante unos segundos.

A continuación se obtuvo la suspensión celular a partir de muestras sanguíneas y de glándula mamaria. En el caso de la sangre, se añadieron 70  $\mu$ l de PBS 0.01M a 20  $\mu$ l de sangre. En cuanto a la glándula mamaria, tras disgregar el tejido se realizó una incubación con tripsina al 0.5% a +37°C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 3 ml de PBS al 1% y suero (9:1) y se incubó en hielo para ayudar a precipitar los restos de tejido. Se recuperó el sobrenadante y posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante resultante se le añadieron 500  $\mu$ l de PBS al 1% y suero (9:1). La suspensión celular obtenida se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión al 1% en proporciones diferentes según el

tejido. Así, 30  $\mu$ l de sangre diluida fueron mezclados con 80  $\mu$ l de agarosa y 35  $\mu$ l de suspensión celular procedente de la glándula mamaria con 80  $\mu$ l de agarosa. Una vez realizada la mezcla, se aplicaron unas gotas sobre el portaobjetos recubierto de una primera capa de agarosa y se cubrió con un cubreobjetos dejándolo reposar en horizontal a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 6 minutos. Pasado este tiempo se quitaron los cubreobjetos.

El siguiente paso consistió en la lisis celular realizada en una solución de lisis alcalina que contenía: NaCl 2.5 M, Na-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 6 gr de NaOH y Lauryl Sarcosine al 1%. En el caso de las muestras procedentes de la sangre, a dicha solución de lisis se añadió Tritón X100 al 1% y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%. En ambos casos la solución de lisis se ajustó a  $\text{pH} \geq 13$ . Los portaobjetos fueron sumergidos en la solución de lisis durante 2 horas a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo de lisis, los portaobjetos se colocaron en la cubeta de electroforesis y se cubrieron con tampón de electroforesis ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM, NaOH 300 mM,  $\text{pH} \geq 13$ ). El tiempo de incubación necesario para conseguir desenrollar el ADN fue de 20 minutos para las muestras de sangre y de 40 minutos en el caso de la glándula mamaria. A continuación se realizó la electroforesis alcalina a 25 V y 300 mA durante 20 minutos en el caso de la sangre y 40 minutos para las muestras procedentes de la glándula mamaria. Al finalizar se realizaron 3 lavados en tampón Tris-HCl  $\text{pH}$  7.5, previamente enfriado, de 5 minutos cada uno. Los portaobjetos se dejaron secar al aire hasta el momento del análisis.

Antes de observar las muestras al microscopio, los portaobjetos secados se hidrataron en agua ultrapura durante 10 minutos y a continuación se tiñeron con DAPI (4,6 Diamino-2-Phenylindole Dihydrachloride Hydrate) a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 3 minutos. La captación y análisis de imagen se realizó con el programa *analySIS*<sup>®</sup>.

Las muestras se ensayaron por duplicado y se analizaron más de 90 células por muestra. La cuantificación del daño en el ADN consistió en el cálculo del porcentaje de la señal obtenida de la cola respecto al total (Figura 13).

#### **6.4.2 Detección de 8-oxo-dG.**

Los niveles de 8-oxo-dG en el ADN de glándula y adenocarcinomas mamarios fueron determinados en el Servicio de Análisis Clínicos del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Valencia.

### Aislamiento y digestión del ADN nuclear

A partir del ADN genómico extraído de la glándula mamaria y del tejido tumoral (punto 2.1 de este apartado), se aisló el ADN nuclear empleando alcohol cloroformo isoamil (24:1) para la eliminación de proteínas. El ADN aislado se lavó 2 veces con etanol 70%, se secó y se disolvió en 200 µl de Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, NaCl 100 mM pH 7.0 para la posterior digestión enzimática. Se incubaron 200 µg de ADN, a una concentración de 5 µg/µl, con 100 unidades de DNasa I en 40 µl de Tris-HCl 10 mM y 10 µl de MgCl<sub>2</sub> 0.5 M durante 1 hora a +37°C. A continuación, se añadieron 15 µl de acetato sódico 0.5 M para bajar el pH de la mezcla de reacción a 5.1, 10 µl de nucleasa P1 (5 unidades) y 30 µl de ZnSO<sub>4</sub> 10 mM. Esta mezcla fue incubada durante 1 hora a +37°C en agitación. Transcurrido este tiempo, se reajustó el pH con 100 µl de Tris-HCl 0.4 M a pH 7.8 y, tras añadir 20 µl de fosfato alcalino (3 unidades), las muestras se incubaron nuevamente durante 30 minutos a +37°C en agitación. Las enzimas se precipitaron con 5 volúmenes de acetona y se separaron por centrifugación. Los restos de sobrenadante se eliminaron por evaporación.

### Ensayo de la 8-oxo-dG

El ADN hidrolizado fue disuelto en agua ultrapura para HPLC y filtrado a través de un poro de 0.2 µm antes de aplicar las muestras en una columna “Spherisorb ODS2 HPLC” (Waters Cromatografía S.A.) (4.6 x 250 mm); 5 µm de tamaño de partícula). La cantidad de 8-oxo-dG y deoxiguanosina (dG) detectada en el ADN digerido se midió por electroquímica, a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y por absorbancia de UV a 254 nm, respectivamente. El tampón de carrera para la 8-oxo-dG de ADN nuclear estuvo compuesto por fosfato potásico 50 mmol/l a pH 5.1 y acetonitrilo al 5%. El tiempo de retención fue de 7.5 minutos.

## **7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LEPTINA (WESTERN BLOT).**

Para la detección de proteínas plasmáticas de Leptina se inmunoprecipitaron 200 µl de plasma sanguíneo. Previamente, a partir de las muestras de sangre total obtenidas en el momento del sacrificio, se separaron los elementos formes y el plasma mediante una centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. Las muestras de plasma fueron incubadas con anticuerpo policlonal para Leptina (Rabbit polyclonal to Leptin, Abcam -ab17629-) a una concentración de 1:2000, según la tecnología IgG Magnetic Beads (Millipore) durante 16

horas a +4°C. A continuación se incubaron a +80°C durante 10 minutos y se analizaron mediante *Western Blot*. Tras una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12% durante una hora y media a +4°C, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond PVDF (GE Healthcare) a 100 mV durante una hora. A continuación, la membrana fue bloqueada con leche en polvo desnatada al 5% en Tween-Tris buffer al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo policlonal para Leptina, mencionado anteriormente, durante 16 horas a +4°C en agitación; y, posteriormente, con el anticuerpo secundario (Anti-rabbit IgG polyclonal HRPO, Sigma -A6154-), a una concentración 1:5000, durante una hora y media a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se realizaron varios lavados con TBS-T 0.1% y las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia, mediante el sistema ECL (Millipore) y reveladas en film de autoradiografía (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). El contenido en Leptina se determinó por densitometría gracias al sistema de análisis de imágenes Gel Doc 2000 y el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Los valores fueron normalizados en relación al valor medio de un control interno por triplicado y relativizados a 1ml de plasma.

#### **D. ANÁLISIS DE DATOS.**

Dado que los datos de cáncer no siguen una distribución normal y las varianzas son heterogéneas, se aplicó una estadística no paramétrica en todo el estudio para dar homogeneidad a los análisis estadísticos. Se utilizó el software PAW Statistics 17 (antes SPSS) y el StatistiXL. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

#### **1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.**

##### **1.1 CARCINOGENESIS.**

Los datos obtenidos de los ensayos biológicos proceden de dos situaciones experimentales distintas, cada una con diferente exactitud y precisión de las medidas tomadas. Así, se han analizado de forma separada los datos procedentes de las mediciones tomadas *in vivo* durante las palpaciones semanales y los datos obtenidos en el momento del sacrificio de los animales. Los datos de las palpaciones (estudio temporal) fueron siempre analizados en conjunto. Las pruebas estadísticas empleadas se citan a continuación.

***Datos cualitativos.***

1. Estudio temporal: Comparación entre curvas mediante el análisis de la varianza no paramétrico de 2 factores -test de Friedman-.
2. Sacrificio: Prueba de la ji-cuadrado ( $\chi^2$ ). Los tratamientos con dos caracteres fueron de dos tipos: comparación de frecuencias observadas, y comparación de reparticiones observadas frente a reparticiones teóricas dadas por la hipótesis nula de equiprobabilidad. En el caso de más de dos caracteres, la estrategia del tratamiento se basó en el análisis de relación de todos ellos ([1674]). Se aplicaron sistemáticamente los criterios de Lewontin y Felsenstein para las frecuencias calculadas de todas las tablas 2xN.

***Datos cuantitativos.***

1. Estudio temporal: la comparación entre curvas de los parámetros de la carcinogénesis se realizó mediante el mismo análisis que para los datos cualitativos.
2. Sacrificio: Prueba no paramétrica de la U de Mann-Withney para la comparación de 2 poblaciones y test no paramétrico de Kruskal-Wallis para varias poblaciones.

## **1.2 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y LA MADURACIÓN SEXUAL.**

***Datos cualitativos.***

El análisis de la distribución de los distintos estados de apertura vaginal, se realizó mediante la prueba de la ji-cuadrado ( $\chi^2$ ).

***Datos cuantitativos.***

Para el análisis ponderal a lo largo de todo el estudio se utilizó el test estadístico de Modelos No lineales Mixtos ([3935]) para ajustar los datos de cada grupo a una función de regresión asintótica. Los datos de peso e índices de masa corporal de los animales en momentos determinados del ensayo (sacrificios o días específicos alrededor del inicio de la pubertad), así como los datos de los distintos estados de maduración, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney.

## **2. HISTOLOGÍA, MORFOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.**

### ***Datos cualitativos.***

Se utilizó la prueba de la ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) para analizar los datos obtenidos del estudio histopatológico de los adenocarcinomas mamarios, la categorización cualitativa de la glándula mamaria, así como para los estudios de inmunohistoquímica (expresión proteica de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , y niveles de lipofuscina en tejido hepático).

### ***Datos cuantitativos.***

Los datos obtenidos del estudio de la función ovárica y en el recuento de estructuras observadas por la técnica *Whole Mount* se analizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney. El análisis del número de mitosis halladas en los adenocarcinomas mamarios también se realizó con el mismo test estadístico.

Por otro lado, las correlaciones realizadas en este trabajo se valoraron mediante la correlación no paramétrica Tau-b de Kendall.

## **3. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

### ***Datos cualitativos.***

Un número de muestras plasmáticas analizadas presentaron niveles de estradiol por debajo de la sensibilidad del método. Se realizó, de forma paralela al estudio cuantitativo, la prueba de la ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) para analizar la distribución de dichas muestras.

### ***Datos cuantitativos.***

El resto de los datos de los estudios bioquímicos y los de los estudios moleculares se analizaron mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

## **4. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.**

El análisis de los datos obtenidos en el estudio del perfil de expresión génica en glándula y adenocarcinomas mamarios se realizó en colaboración con una especialista en bioestadística. Las imágenes resultantes de la hibridación de los “chips” de *Microarrays* se procesaron mediante el programa *Microarray Analysis Suite 5.0* (Affymetrix). Los datos

obtenidos fueron procesados utilizando el método RMA ([7764]), mediante el cual se realizaron los procesos de corrección de *background*, normalización y *summarization* (integración de los distintos valores de las diferentes sondas de cada gen en un único dato). A continuación, dichos datos fueron sometidos a varios filtros no específicos para descartar aquellos genes que emitían una señal por debajo del umbral mínimo establecido para cada grupo, así como aquellos de baja variabilidad, es decir con una mínima desviación estándar entre todas las muestras.

La selección de los genes diferencialmente expresados entre las diferentes condiciones se basó en un modelo de análisis lineal según la metodología desarrollada por Smyth ([7765]). Se emplearon diferentes tests estadísticos (*fold change*, valor “t” y “p”) para clasificar los genes según el grado de expresión diferencial que mostraban. Teniendo en cuenta que se realizan varios test de forma simultánea, se reajustó el valor p mediante el método de Benjamini y Hochberg ([7766]).

Los genes seleccionados por estar diferencialmente expresados fueron agrupados para determinar patrones de expresión comunes. Por otro lado, se realizó un análisis de significación biológica, es decir un estudio de la función de estos genes basado en análisis de sobrerrepresentación para poder establecer si los genes que habían sido expresados de forma diferencial aparecían en algunas de las categorías funcionales de la base de datos *Gene Ontology*, y así, relacionarlos con los distintos procesos biológicos.

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el programa R y las bases de datos desarrolladas para el análisis de los *Microarrays* del Proyecto Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Los principales métodos y herramientas utilizados han sido descritos por Gentelman *et al* ([7767]).



INTRODUCCIÓN  
MATERIAL & MÉTODOS  
**RESULTADOS**  
DISCUSIÓN  
CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA



## **A. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL.**

### **1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y MASA CORPORAL.**

#### **1.1. Evolución Ponderal e Índice de Masa Corporal.**

El estudio del crecimiento de los animales de los cinco grupos experimentales se basó en el análisis ponderal, a partir de la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo. Los datos se obtuvieron en las 31 determinaciones semanales que se realizaron. Además, cabe destacar que a lo largo del ensayo se dedicó especial atención a la exploración de las posibles patologías causadas por desequilibrios nutricionales.

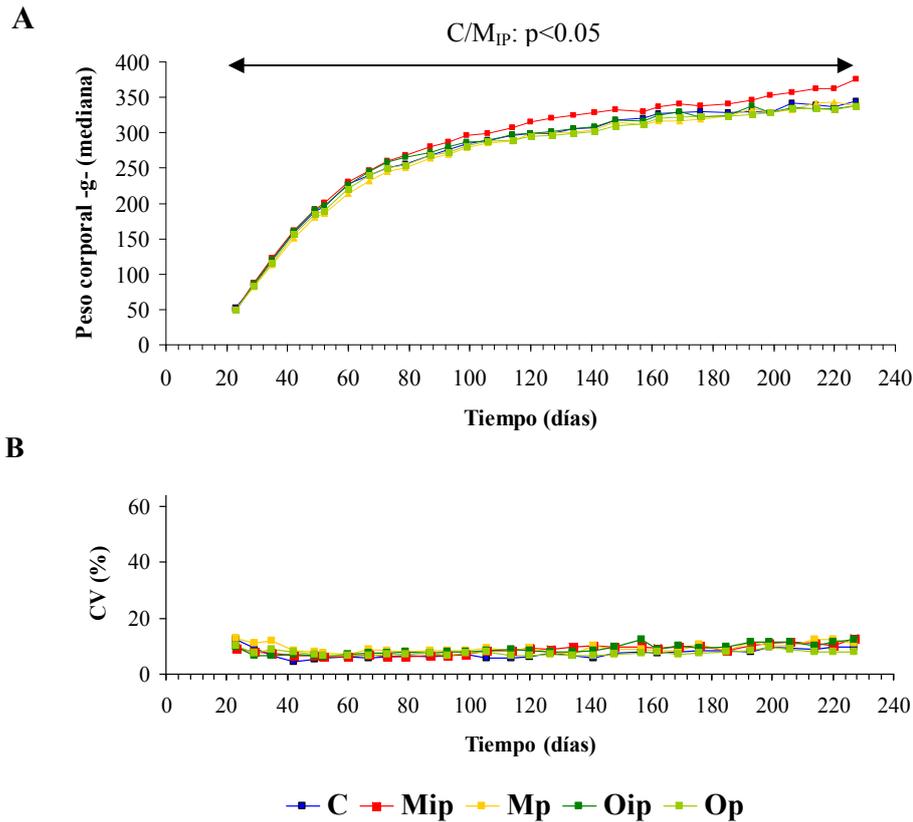
Para este análisis se diseñó una función no lineal que ajustase bien los datos. La función de regresión asintótica empleada fue la siguiente:

$$y = \phi_1 \{1 - \exp(-e^{\phi_2}(t - \phi_3))\}$$

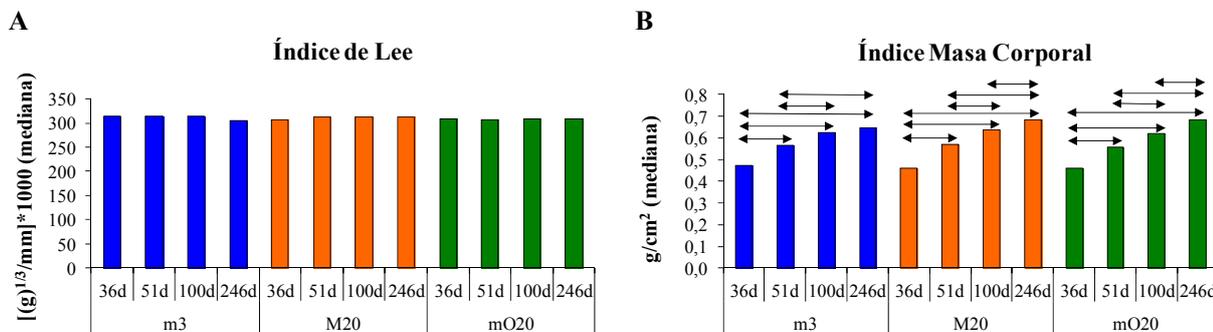
donde  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  y  $\phi_3$  representan respectivamente la asíntota (Asym), el logaritmo (lrc) de la tasa de crecimiento y la ordenada del origen (c0). El método utilizado fue el de los Modelos No Lineales Mixtos, considerando que los parámetros Asym y lrc eran diferentes entre los grupos experimentales.

En la Figura 14 se muestran la evolución ponderal y los coeficientes de variación de los diferentes grupos. Los pesos fueron homogéneos a lo largo del estudio, y los coeficientes de variación fueron uniformemente bajos y de evolución constante en todos los grupos experimentales. La comparación entre grupos indicó un mayor peso en el grupo M<sub>IP</sub> respecto a C ( $p < 0.05$ ).

Utilizando los datos del peso corporal y de la longitud naso-anal obtenidos en el día del sacrificio de cada animal, se analizó la masa corporal de cada uno de ellos a través del Índice de Lee, específico de rata ([839]), y el Índice de Masa Corporal. En todas las condiciones experimentales, el Índice de Masa Corporal aumentó de forma significativa a lo largo del tiempo. Por el contrario, el Índice de Lee presentó unos valores similares a lo largo de todo el estudio (Figura 15 y Anexo Tabla 1).

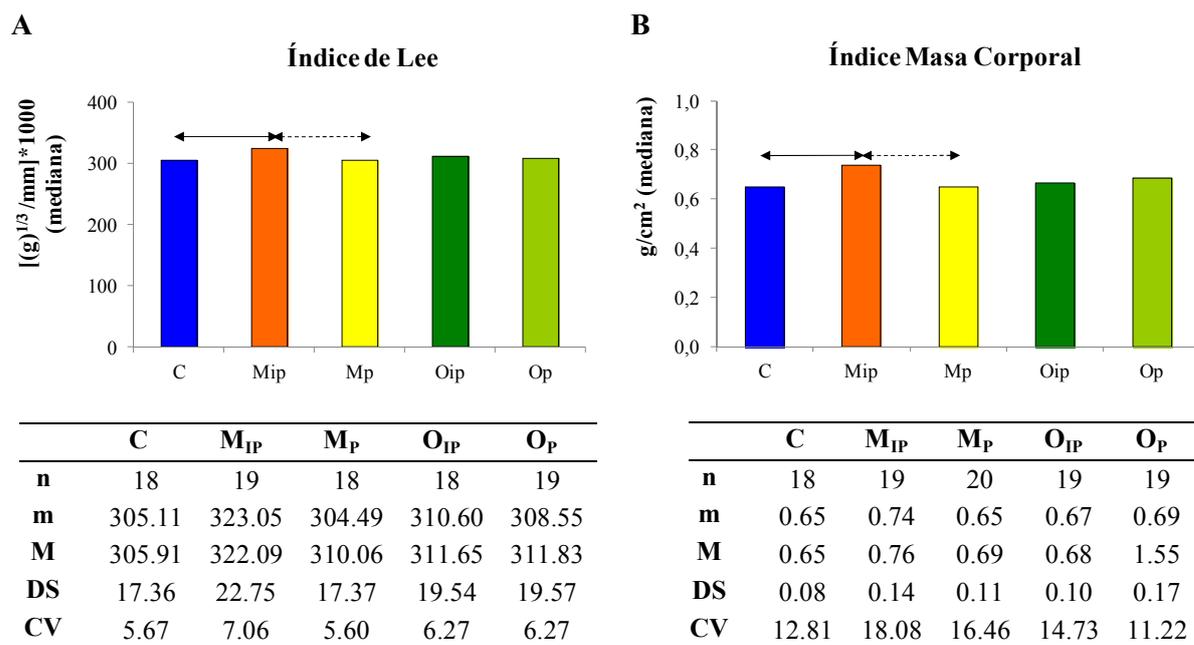


**Figura 14. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales de los diferentes grupos experimentales.** (A) Evolución del peso corporal a lo largo del tiempo. (B) Coeficientes de variación (CV) del peso corporal a lo largo del tiempo.



**Figura 15. Índices de masa corporal en función de la dieta a diferentes edades.** (A) Índice de Lee [ $\{(\text{peso corporal -g-})^{1/3} / \text{longitud naso-anal -mm-}\} \times 10.000$ ]. (B) Índice de Masa Corporal (peso corporal -g-/longitud naso-anal<sup>2</sup> -cm<sup>2</sup>-) 36d: 36 días. 51d: 51 días. 100d: 100 días. 246d: 246 días. 36 i 51 días: m3 (grupos C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>), M20 (grupo M<sub>IP</sub>), mO20 (grupo O<sub>IP</sub>); 100 días y 246 días: m3 (grupo C), M20 (grupos M<sub>IP</sub>+M<sub>P</sub>), mO20 (grupos O<sub>IP</sub>+O<sub>P</sub>). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al comparar las diferentes condiciones experimentales, únicamente se encontraron diferencias significativas o cercanas a la significación en el sacrificio final (246 días) entre M<sub>IP</sub> y los grupos C y M<sub>P</sub>, respectivamente, en los dos índices estudiados (Figura 16).



**Figura 16. Masa corporal de los animales de los grupos experimentales al final del estudio (246 días).** (A) Índice de Lee [ $\{(\text{peso corporal -g})^{1/3} / \text{longitud naso-anal -mm}\} \times 10.000$ ]. (B) Índice de Masa Corporal ( $\text{peso corporal -g} / \text{longitud naso-anal}^2 \text{-cm}^2$ ). n: número de efectivos; M: media; DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

## 1.2. Expresión de Genes que Regulan el Metabolismo de Lípidos.

La relación entre la dieta y el peso corporal se ha caracterizado indirectamente a través del análisis de expresión en hígado de genes implicados en el metabolismo. De esta manera se estudió mediante *Real Time-PCR*, la expresión de los genes que se presentan a continuación.

### 1.2.1. Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ).

Los niveles de expresión de PPAR $\alpha$ , también implicado en la oxidación lipídica, fueron más elevados en los grupos de dieta hiperlipídica que en el control, de forma significativa a los 100 días, y a los 246 en el grupo M<sub>IP</sub>. Además, dicho grupo presentó valores superiores en comparación a los grupos de aceite de oliva a los 51 días y al final del estudio (Figura 17 y Anexo Tabla 2).

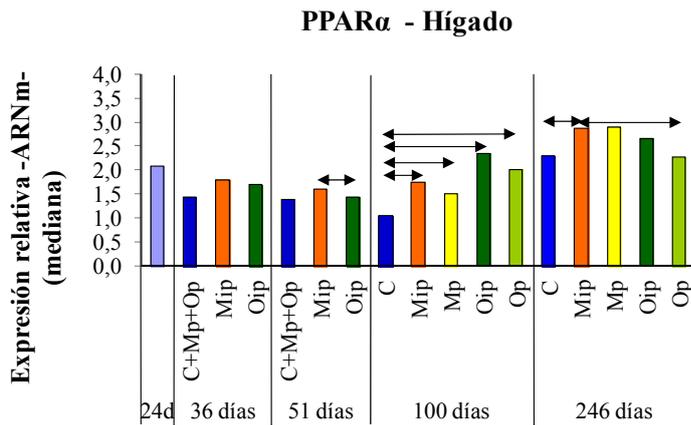


Figura 17. Expresión relativa del ARNm de PPARα en muestras de hígado de los animales de los diferentes grupos experimentales a diferentes edades. 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 1.2.2. Carnitina Palmitoil Transferasa tipo 1a (CPT-1a).

El análisis de esta molécula implicada en la oxidación de los lípidos reveló una mayor expresión en los grupos de dieta hiperlipídica respecto al control de forma significativa en todas las edades excepto a los 51 días, que fue cercana a la significación. Al final del estudio, M<sub>IP</sub> mostró, además, valores superiores, a los dos grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de oliva (Figura 18 y Anexo Tabla 2).

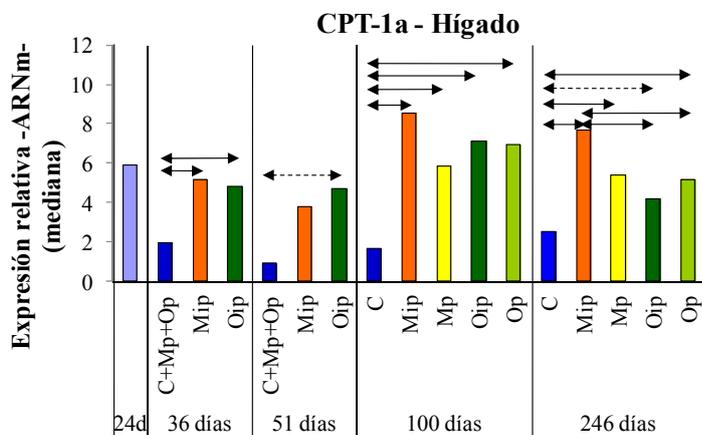
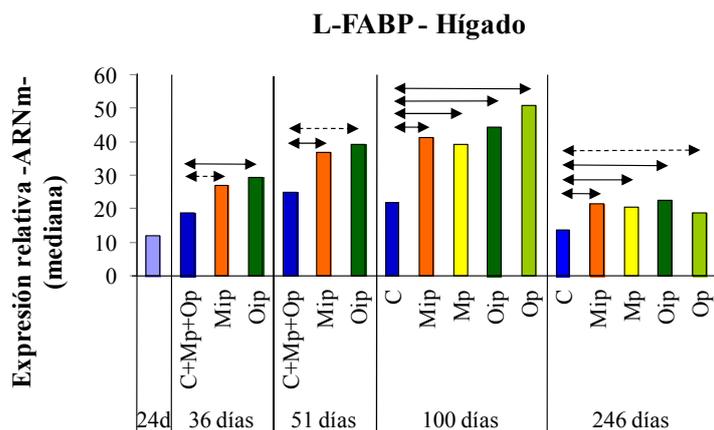


Figura 18. Expresión relativa del ARNm de CPT-1a en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades. 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 1.2.3. Proteína de Unión a Ácidos Grasos en Hígado (L-FABP).

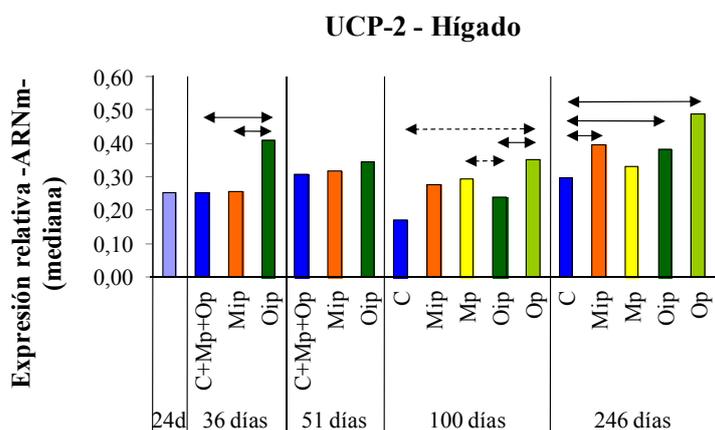
Los resultados del estudio de la expresión de la proteína de transporte L-FABP en el hígado, indicaron un aumento en los grupos de dieta hiperlipídica respecto al grupo control (C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub>) en todas las edades (Figura 19 y Anexo Tabla 3).



**Figura 19.** Expresión relativa del ARNm de L-FABP en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades. 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 1.2.4. Proteína Desacopladora tipo 2 (UCP-2).

La proteína implicada en el proceso de liberación de energía de la cadena respiratoria UCP-2 mostró un nivel de expresión superior a los 36 días de edad en el grupo O<sub>IP</sub> respecto a los otros grupos, mientras que a los 100 días fue el grupo O<sub>P</sub> el que mostró una expresión más elevada, presentando diferencias respecto control y O<sub>IP</sub>. Asimismo, M<sub>IP</sub> también presentó diferencias respecto este último grupo. A los 246 días, M<sub>IP</sub>, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> mostraron valores superiores al grupo control (Figura 20 y Anexo Tabla 3).



**Figura 20.** Expresión relativa del ARNm de UCP-2 en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades. 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

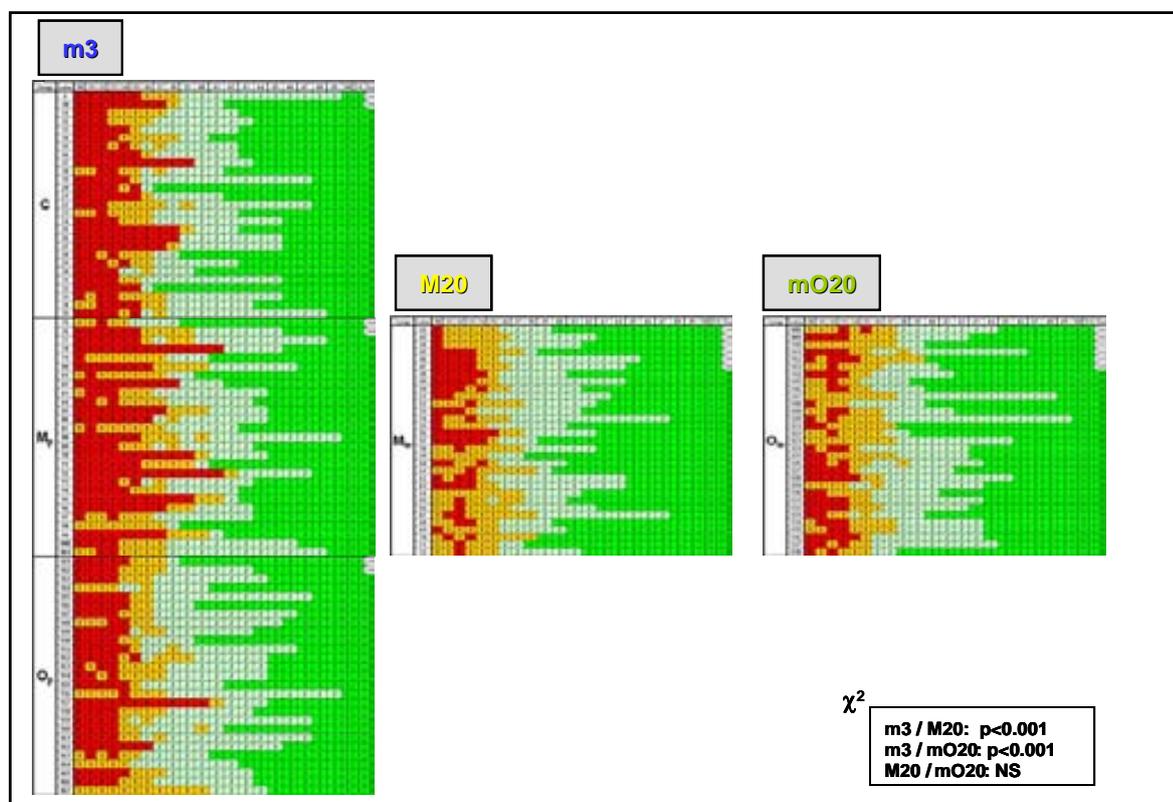
## 2. PUBERTAD.

### 2.1. Clínica.

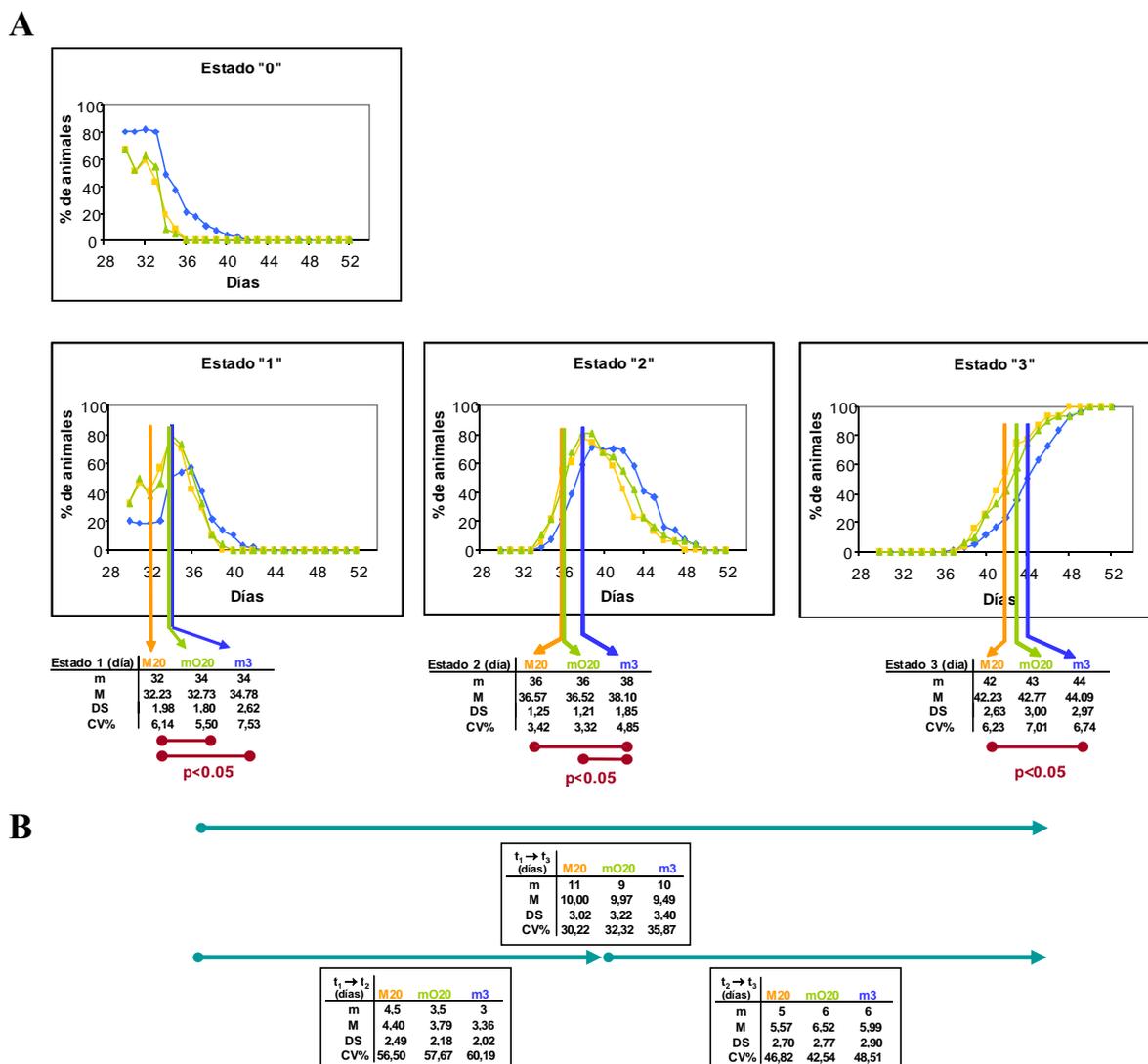
#### 2.1.1. Apertura Vaginal.

Entre los días 30 y 52 de edad los animales fueron explorados diariamente para poder determinar los cambios vaginales (estados 0, 1, 2) y el día de apertura (estado 3). El estudio de la evolución entre estados mostró diferencias significativas entre los animales alimentados con dieta control y los alimentados con las dos dietas hiperlipídicas (Figura 21).

Los animales llegaron a cada uno de los estados categorizados (1-3) en diferentes días (Figura 22). Así, el día de estado 1 se avanzó significativamente en el grupo M<sub>IP</sub> (dieta M20) respecto a los otros grupos, el día de estado 2 se alcanzó antes en los dos grupos de dieta hiperlipídica respecto al control, y el día de apertura vaginal (estado 3) fue significativamente anterior en M<sub>IP</sub> (dieta M20) respecto al control (2 días antes), mientras que O<sub>IP</sub> (dieta mO20) presentó valores intermedios (1 día antes que el control) (Figura 22A). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al tiempo de evolución entre los diferentes estados (1→2, 2→3 y 1→3) por efecto de las dietas (Figura 22B).



**Figura 21. Estudio del estado de apertura vaginal** (rojo: 0, amarillo: 1, verde claro: 2, verde oscuro: 3) de cada animal en función del tiempo (días) para las diferentes dietas experimentales.  $\chi^2$ : Pearson ji-cuadrado; NS: diferencias no significativas.



**Figura 22. A) Distribución de los animales (%) en cada uno de los estados de maduración a lo largo del tiempo.** Para los estados 1, 2 i 3 se indica mediana (m), media (M), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) del día de llegada al estado por dieta. p<0.05: diferencias significativas. B) Evolución en días entre los diferentes estados.

Para cada estado de maduración (1, 2 y 3) no hubo diferencias en el peso entre grupos, es decir, no se encontraron diferencias en el peso de los animales en el día que llegaban a cada estado específico (Figura 23). Por otra parte, a partir de los pesos semanales se estimó el peso diario de los animales y se compararon los diferentes grupos en días concretos (días en los cuales algún grupo debutaba en algún estado) (Tabla 6). En todos los días analizados, el peso del grupo M<sub>IP</sub> (dieta M20) fue significativamente superior al del grupo C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub> (dieta m3) excepto en el día 44, que fue próximo a la significación. Los animales del grupo O<sub>IP</sub> (dieta mO20) tuvieron siempre valores intermedios.

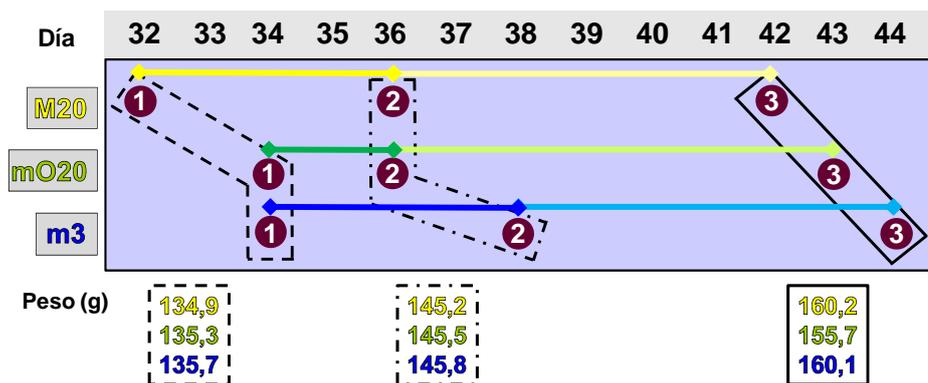


Figura 23. Mediana del día y peso al inicio en cada estado de maduración sexual según la dieta. M20: grupo M<sub>IP</sub>; mO20: grupo O<sub>IP</sub>; m3: grupo C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>.

	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
M20	135,4 (136,5)	140,2 (141,4)	145,1 (146,3)	150,2 (151,1)	160,6 (160,9)	163,1 (163,3)	165,7 (165,8)						
mO20	133,2 (133,4)	138,9 (138,9)	143,8 (143,7)	148,7 (148,5)	158,6 (158,3)	161,1 (160,7)	163,6 (163,1)						
m3	133,2 (133,4)	134,5 (135,3)	138,9 (139,9)	143,5 (144,8)	153,4 (154,7)	155,7 (157,1)	158,1 (159,6)						

Taula 6. Peso de los animales en los días de debut de cada estado según la dieta. M20: M<sub>IP</sub>; mO20: O<sub>IP</sub>; m3: C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>. En negrita se indica el peso correspondiente al grupo que debutaba en algún estado en ese día. Los valores sin paréntesis corresponden a la mediana y entre paréntesis a la media. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas (p<0.05). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación (0.05<p<0.1).

### 2.1.2. Ciclo Estral.

A partir del día en el que se alcanzó el estado 3 (apertura vaginal) y hasta el día 52 de edad, se determinó diariamente la fase del ciclo estral por citología vaginal. No se encontraron diferencias en el período comprendido entre el día de apertura vaginal y el primer estro entre grupos (Taula 7).

	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	M <sub>IP</sub>	O <sub>IP</sub>
n	78	30	31
m	1	1	1
M	1.22	1.40	1.19
DS	1.76	1.35	1.58
CV	144.14	96.75	132.33

Taula 7. Período comprendido (días) entre el día de estado 3 y el primer estro.

n: número de efectivos. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). m: mediana.

## 2.2. Función Ovárica y Endometrial.

El análisis de los cortes histológicos realizados a partir de los ovarios obtenidos en las distintas edades mostró que a los 36 días el grupo control (C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>) presentó más folículos secundarios que los otros grupos y más atrésicos que M<sub>IP</sub>. A los 51 días el grupo control (C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>) mostró menos cuerpos lúteos que los grupos alimentados con dieta hiperlipídica (M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub>) (Tabla 8).

	Folículos Secundarios	Folículos Terciarios	Cuerpos Lúteos	Cuerpos Albicans	Folículos Atrésicos
<b>24 días</b>	8.0 (4.7-12.9)	0.0 (0.0-0.5)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	12.0 (6.9-18.9)
<b>36 días</b>					
C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	9.0 (7.6-13.4) ↑↑	0.0 (0.0-1.0)	2.0 (0.0-10.0)	0.0 (0.0-0.5)	12.5 (8.1-18.5) ↑
M <sub>IP</sub>	6.5 (3.6-11.5) ↓	0.0 (0.0-1.5)	4.0 (0.0-6.5)	0.0 (0.0-0.0)	8.5 (5.6-11.5) ↓
O <sub>IP</sub>	6.0 (3.6-10.5) ↓	0.0 (0.0-1.5)	4.5 (2.0-9.9)	0.0 (0.0-0.0)	11.0 (5.7-16.0)
<b>51 días</b>					
C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	3.5 (2.0-7.0)	0.0 (0.0-1.0)	7.5 (2.1-11.0) ↑↑	0.0 (0.0-2.0)	6.0 (1.6-10.5)
M <sub>IP</sub>	4.5 (0.0-10.0)	0.0 (0.0-1.5)	12.5 (8.0-15.9) ↓	0.0 (0.0-1.9)	7.0 (2.1-10.0)
O <sub>IP</sub>	4.5 (0.0-8.9)	0.0 (0.0-0.0)	10.5 (6.1-14.0) ↓	0.0 (0.0-5.5)	4.5 (2.6-11.8)

**Taula 8. Análisis histológico de la función ovárica de los animales de los grupos experimentales a los 24, 36 y 51 días del estudio.** [mediana (media ± DS)]. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En cuanto al estudio de la función del endometrio, todas las muestras presentaron un estado inactivo a los 24 días de edad de los animales. A los 36 días, el 50% (3/6) de los animales del grupo control, mostraron un endometrio inactivo y ningún signo de ovulación (ningún cuerpo lúteo), mientras que un 33% (2/6) del grupo M<sub>IP</sub> y un 0% (0/6) del O<sub>IP</sub> presentaron un endometrio inactivo. A partir de los 51 días todos los animales mostraron endometrio activo.

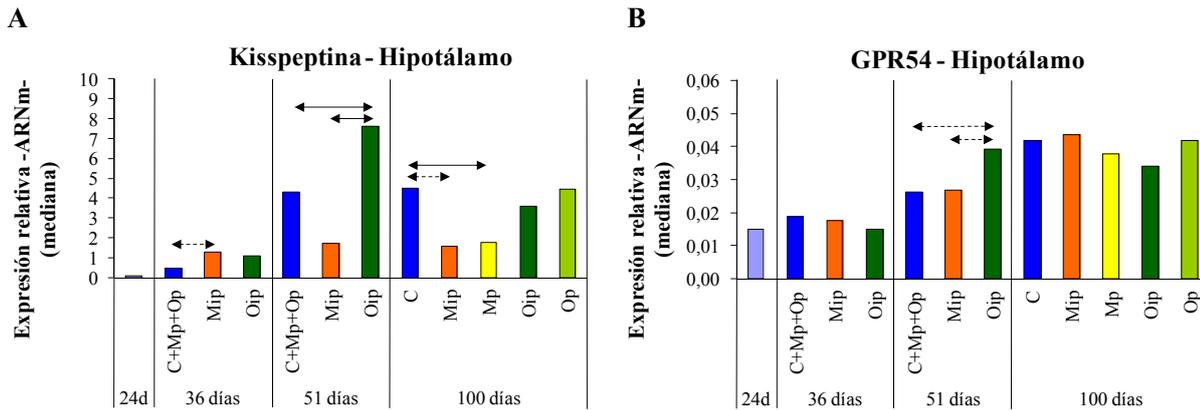
## 2.3. Caracterización Molecular.

### 2.3.1. Inicio de la Pubertad.

Se analizó la expresión génica de un marcador molecular de la maduración sexual (Kisspeptina) y su receptor (GPR54) mediante *Real Time*-PCR en muestras de hipotálamo entre los 24 y los 100 días de edad (Figura 24 y Anexo Tabla 4). A los 36 días se observó una mayor expresión de Kisspeptina en M<sub>IP</sub> respecto el control (C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>;  $0.05 < p < 0.1$ ). Mientras

que a los 51 días, el grupo O<sub>IP</sub> es el que mostró una expresión significativamente superior que el resto de grupos. En cambio, a 100 días, el grupo control fue el que expresó más Kisspeptina respecto los grupos M<sub>IP</sub> ( $0.05 < p < 0.1$ ) y M<sub>P</sub> ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del receptor GPR54, ni al correlacionar la expresión de Kisspeptina con el peso corporal de los animales en las distintas edades (datos no mostrados).



**Figura 24.** Expresión relativa del ARNm de Kisspeptina (A) y GPR54 (B) en hipotálamo de los grupos experimentales a diferentes edades. 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

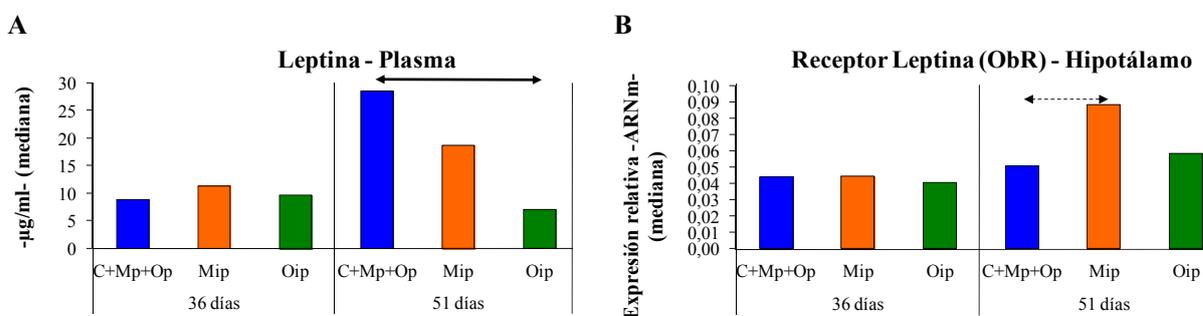
Posteriormente, se intentó analizar la expresión de Kisspeptina y su receptor en glándula mamaria y tumor, ya que dicha proteína ha sido descrita como un posible supresor de progresión tumoral. Los ensayos de estandarización (pruebas eficiencia) revelaron que la expresión de dichos ARNm en ambos tejidos estaba por debajo de la sensibilidad del método.

### 2.3.2. Leptina y su Receptor.

La hormona adipocitaria Leptina y su receptor (ObR) fueron analizados en distintos tejidos y por diferentes técnicas. El estudio de la expresión se realizó por *Real Time*-PCR en glándula, adenocarcinomas mamarios e hipotálamo. Asimismo se analizaron los niveles de proteína Leptina en plasma mediante *Western Blot*.

Los distintos resultados obtenidos se presentarán en diferentes apartados para así poder enmarcarlos adecuadamente en su contexto funcional. De esta manera, y en relación al inicio de la pubertad, se presentan a continuación los resultados de los análisis en hipotálamo y plasma.

A los 51 días se observó un aumento significativo de los niveles plasmáticos de la proteína Leptina en el grupo control respecto al O<sub>IP</sub>, mientras que el estudio de la expresión de ARNm del receptor de Leptina (ObR) en hipotálamo mostró un aumento significativo en el grupo M<sub>IP</sub> (Figura 25 y Anexo Tabla 5).



**Figura 25. Detección por *Western Blot* de los niveles de Leptina en plasma (A) y expresión relativa del ARNm de ObR en hipotálamo (B) de los grupos experimentales en edad peripuberal.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

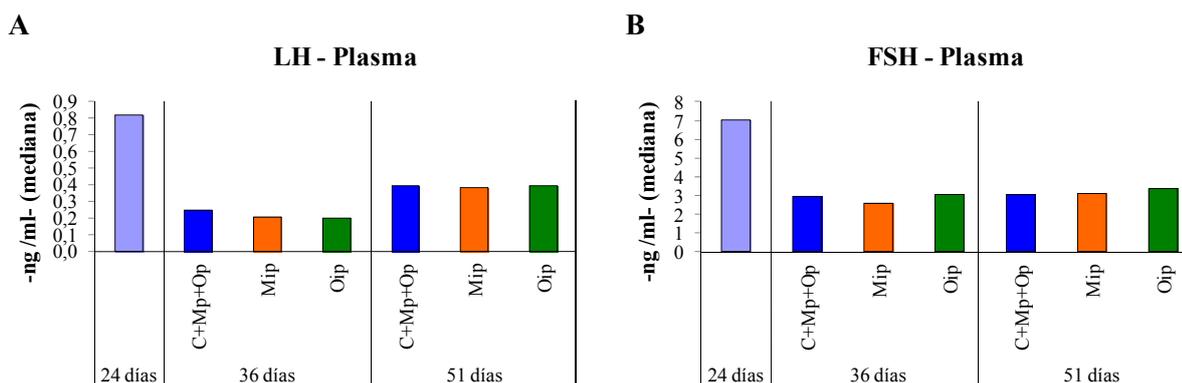
### 3. ESTADO HORMONAL.

La evaluación del estado hormonal consistió en el análisis de los niveles plasmáticos de cuatro hormonas (LH, FSH, estradiol y progesterona) y del estudio de los receptores hormonales en glándula y adenocarcinomas mamarios.

#### 3.1. Niveles Plasmáticos Hormonales.

##### 3.1.1. LH y FSH.

Las hormonas gonadotrópicas, LH y FSH, fueron analizadas en plasma a fin de evaluar la maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y por tanto el inicio de la pubertad. Por ese motivo y en relación a la pubertad, sólo se estudiaron los animales a los 24, 36 y 51 días. Tal y como se observa en la Figura 26 y en Anexo Tabla 6, el estudio de los niveles plasmáticos de dichas hormonas no reveló diferencias entre los distintos grupos experimentales.



**Figura 26. Niveles plasmáticos de LH (A) y FSH (B) de los grupos experimentales en edad peripuberal.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

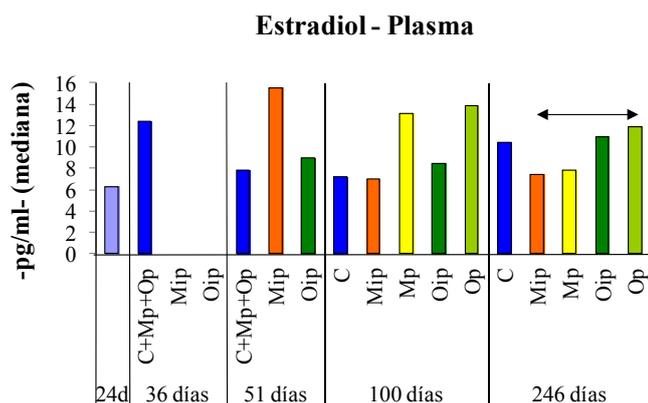
### 3.1.2. Estradiol.

En el análisis de los niveles plasmáticos de  $E_2$  se observó un elevado porcentaje de muestras con niveles inferiores a la sensibilidad del método (5 pg/ml) en todos los grupos experimentales. A edades intermedias este porcentaje no pudo ser analizado estadísticamente entre grupos debido al bajo número de muestras. Sin embargo al final del estudio sí pudo realizarse dicho análisis, encontrándose un porcentaje de muestras con niveles no detectables de estradiol significativamente menor en el grupo  $M_{IP}$  que en el resto de grupos (Tabla 9).

	C	$M_{IP}$	$M_P$	$O_{IP}$	$O_P$
<b>&gt; 5 pg/ml</b>	3 (15.8%)	14 (70%)	2 (10.5%)	4 (22.2%)	5 (27.8%)
<b>&lt; 5 pg/ml</b>	16 (84.2%)	6 (30%)	17 (89.5%)	14 (77.8%)	13 (72.2%)
<b>n</b>	19	20	19	18	18

**Tabla 9. Número de muestras con valores de Estradiol superiores e inferiores a la sensibilidad del método (>5pg/ml) de los grupos experimentales al final del estudio.** n: número total de efectivos.

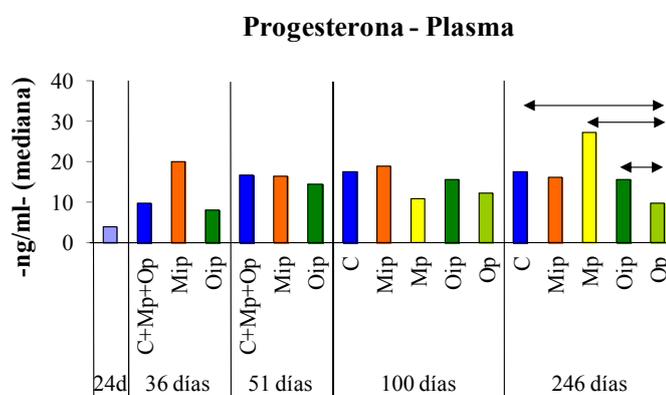
El análisis cuantitativo de los niveles de  $E_2$ , realizado con los valores superiores a 5 pg/ml, sólo mostró diferencias significativas al final del estudio, donde el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz  $M_{IP}$  presentó valores inferiores respecto al grupo  $O_P$  (Figura 27 y Anexo Tabla 7).



**Figura 27. Niveles plasmáticos de Estradiol de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 3.1.3. Progesterona.

En el análisis de los niveles plasmáticos de Progesterona se observó a los 246 días un aumento en el grupo  $M_p$  y una disminución en el grupo  $O_p$ , respecto al control,  $M_p$  y  $O_{ip}$ . No se hallaron diferencias entre grupos a otras edades (Figura 28 y Anexo Tabla 7).

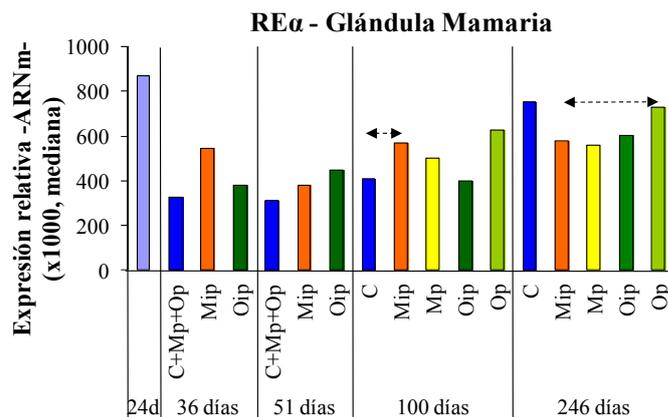


**Figura 28. Niveles plasmáticos de Progesterona de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 3.2. Expresión del ARNm en los Receptores Hormonales en Glándula Mamaria.

#### 3.2.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ).

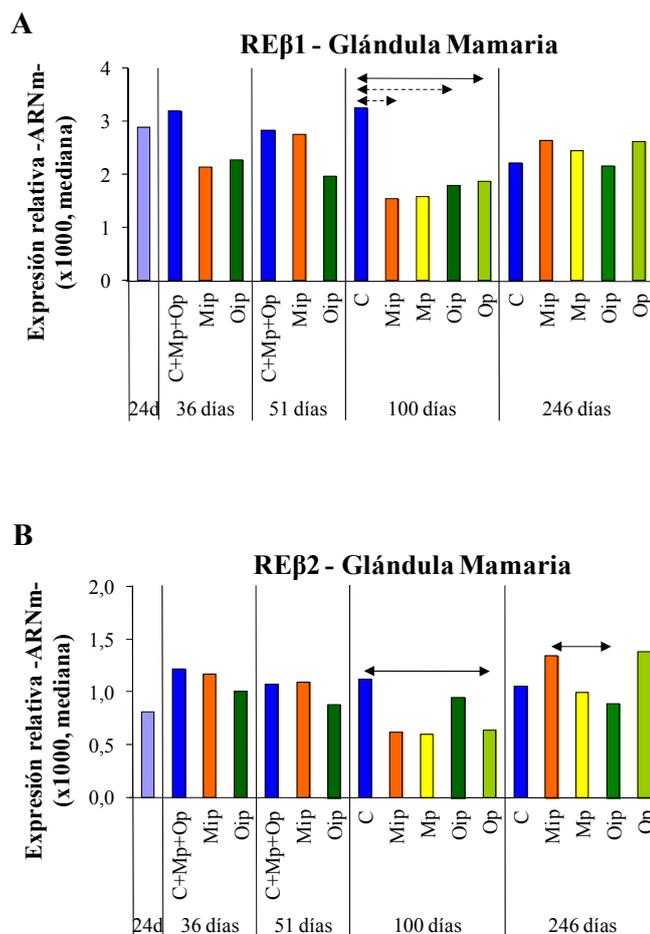
Tal y como muestra la Figura 29 y en el Anexo Tabla 8, la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  mostró pocas diferencias entre los distintos grupos. Así los niveles de este receptor fueron superiores en el grupo M<sub>IP</sub> respecto al control a los 100 días e inferiores a O<sub>p</sub> al final del ensayo.



**Figura 29. Expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 3.2.2. Receptor de Estrógenos $\beta$ 1 y $\beta$ 2 (RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2).

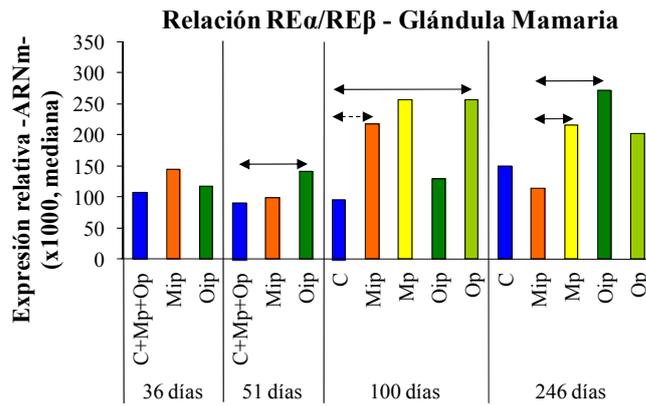
Los niveles de expresión de los receptores de estrógenos  $\beta$ 1 fueron superiores a los del  $\beta$ 2 en todos los grupos experimentales. Los resultados del análisis de dichos receptores en glándula mamaria mostraron unos niveles inferiores en los grupos de dieta hiperlipídica respecto al control a los 100 días, siendo significativo en el caso del grupo O<sub>p</sub>. Al final del ensayo, O<sub>p</sub> mostró valores inferiores a M<sub>IP</sub> para RE $\beta$ 2 (Figura 30 y Anexo Tabla 9).



**Figura 30. Expresión relativa del ARNm de RE $\beta$ 1 (A) y RE $\beta$ 2 (B) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).**

### 3.2.3. Relación RE $\alpha$ y RE $\beta$ total.

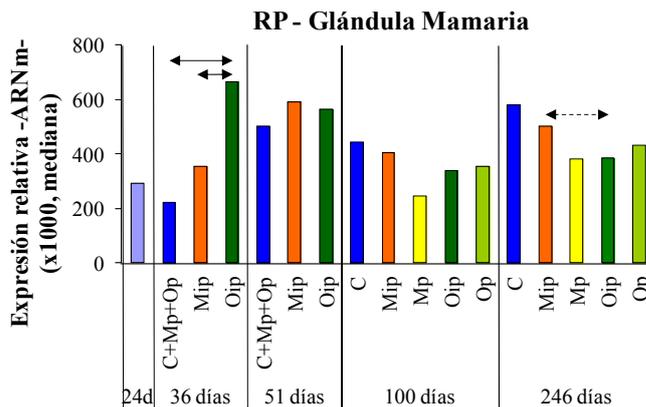
Se analizó la relación entre los niveles de ARNm de RE $\alpha$  y de las dos isoformas del  $\beta$  (RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2) en las diferentes edades del estudio. En general, los resultados mostraron ratios superiores en los grupos de dieta hiperlipídica que en el control (a excepción de M<sub>IP</sub> al final del ensayo) (Figura 31 y Anexo Tabla 10).



**Figura 31. Relación entre la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 3.2.4. Receptor de Progesterona (RP).

El estudio del receptor de progesterona en glándula mamaria reveló unos niveles de expresión significativamente superiores en el grupo O<sub>IP</sub> a los 36 días de edad, mientras que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en las otras edades analizadas (Figura 32 y Anexo Tabla 11).



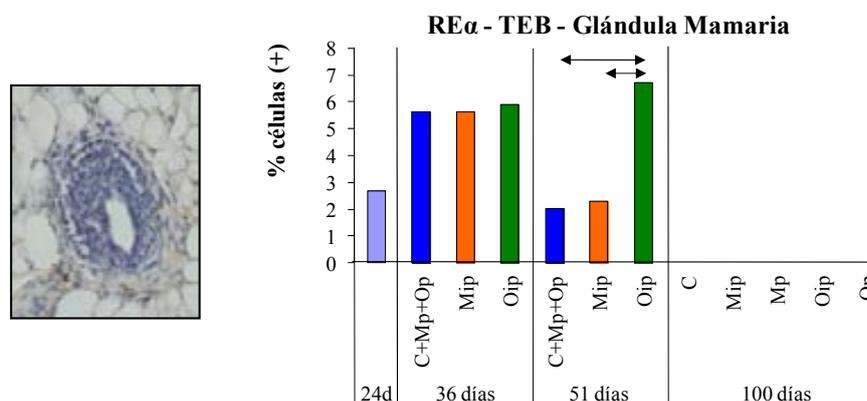
**Figura 32. Expresión relativa del ARNm de RP en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 3.3. Expresión de Proteína de los Receptores Hormonales RE $\alpha$ Y RE $\beta$ en Glándula Mamaria.

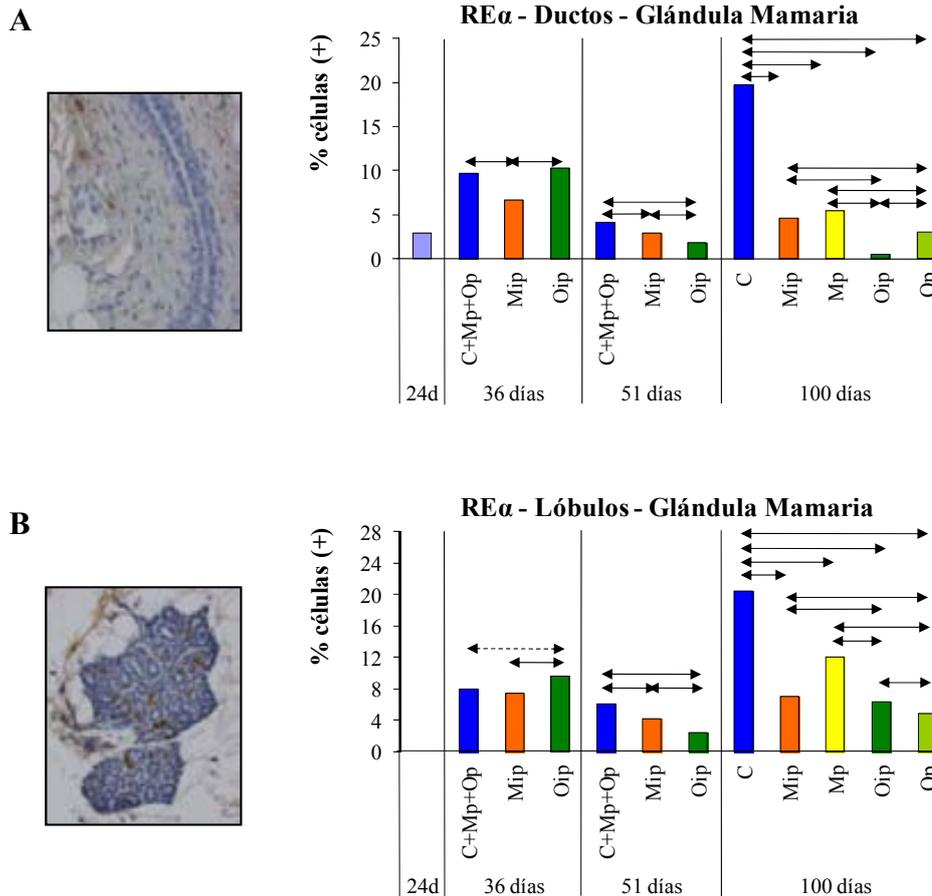
El análisis de la expresión proteica de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  se realizó mediante inmunohistoquímica. Para ello se calculó el porcentaje de células marcadas (positivas) respecto las no marcadas, en 8 campos de gran aumento (CGA). El análisis se realizó en distintas estructuras epiteliales: TEBs (yemas terminales), ductos y lóbulos.

#### 3.3.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ).

En las Figuras 33 y 34, y en Anexo Tabla 12, se muestra el análisis de RE $\alpha$  en las distintas estructuras epiteliales. El estudio en los TEBs mostró un aumento del porcentaje de células positivas en el grupo O<sub>IP</sub> respecto a los otros grupos a los 51 días de edad. A los 100 días no se observaron este tipo de estructuras epiteliales indiferenciadas (Figura 33). Por otro lado, el estudio de los ductos reveló una disminución de RE $\alpha$  en M<sub>IP</sub> respecto control y O<sub>IP</sub> a los 36 días. A los 51 y 100 días, el grupo control es el que mostró mayor porcentaje de células positivas, seguido de los grupos alimentados con dieta de aceite de maíz y los de aceite de oliva (Figura 34A). Por lo que se refiere a las estructuras lobulares, presentaron un patrón muy similar al obtenido en los ductos, especialmente a los 51 y 100 días. A los 36, O<sub>IP</sub> mostró una mayor positividad que el resto de grupos (Figura 34B).



**Figura 33. Índice de positividad de RE $\alpha$  en TEB de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Para cada una de las estructuras se muestra una imagen representativa de la detección del receptor RE $\alpha$  (200X). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

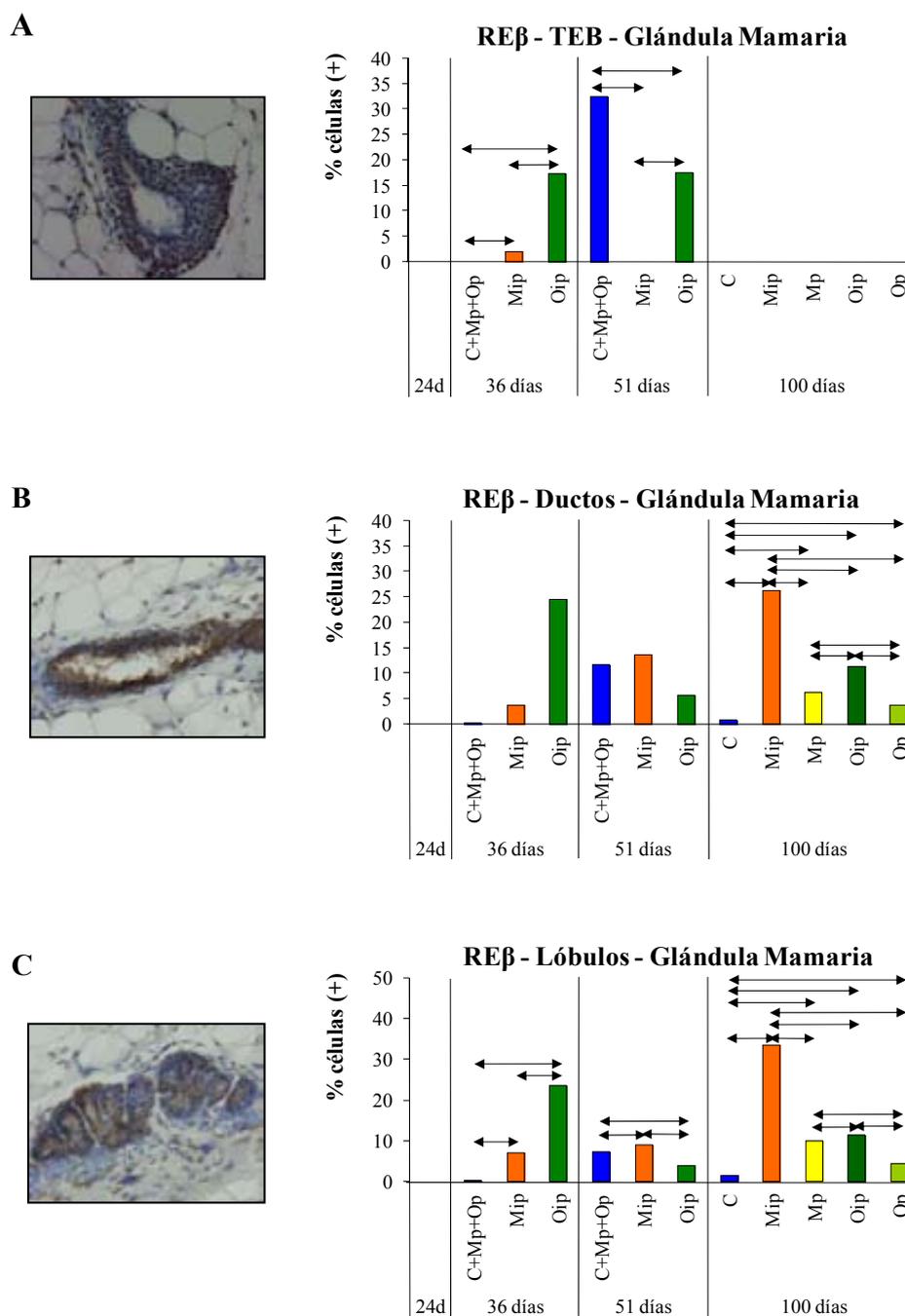


**Figura 34. Índice de positividad de REα en ductos (A) y lóbulos (B) de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Para cada una de las estructuras se muestra una imagen representativa de la detección del receptor REα (200X). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 3.3.2. Receptor de Estrógenos β (REβ).

Los resultados del estudio del receptor de estrógenos β en los TEBs indicaron un aumento en los grupos de dieta hiperlipídica, especialmente en el O<sub>IP</sub>, a los 36 días. A los 51 días, el grupo control presentó un mayor porcentaje de células positivas, seguido de O<sub>IP</sub> y M<sub>IP</sub>. A los 100 días no se detectó este tipo de estructura indiferenciada (Figura 35A y Anexo Tabla 13).

De la misma manera que se observó con REα, el porcentaje de células que expresaron REβ fue muy similar en ductos y lóbulos. Así, se observó un aumento de la expresión de dicho receptor en M<sub>IP</sub>, y sobre todo en O<sub>IP</sub>, a los 36 días, y una disminución en este último grupo a los 51 días. Estos resultados fueron estadísticamente significativos en el caso de las estructuras lobulares. A los 100 días, el análisis mostró un aumento de la expresión en todos los grupos alimentados con dieta hiperlipídica respecto al control, destacando M<sub>IP</sub> por encima de los demás grupos (Figura 35B y C y Anexo Tabla 13).



**Figura 35. Índice de positividad de REβ en TEB (A), ductos (B) y lóbulos (C) de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Para cada una de las estructuras se muestra una imagen representativa de la detección del receptor REβ (200X). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 3.3.3. Relación REα y REβ total.

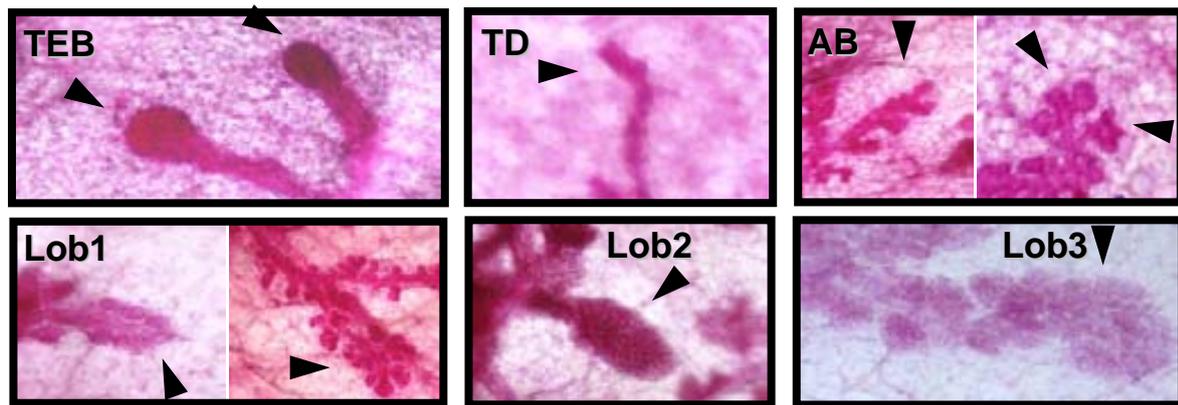
No se pudo realizar el análisis de la relación entre la expresión de proteína de REα y de las dos isoformas del β debido a los bajos niveles de expresión de este último en algunas muestras.

#### 4. CARACTERÍSTICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

##### 4.1. Morfología (*Whole Mount*).

##### 4.1.1. Estructuras Epiteliales Normales.

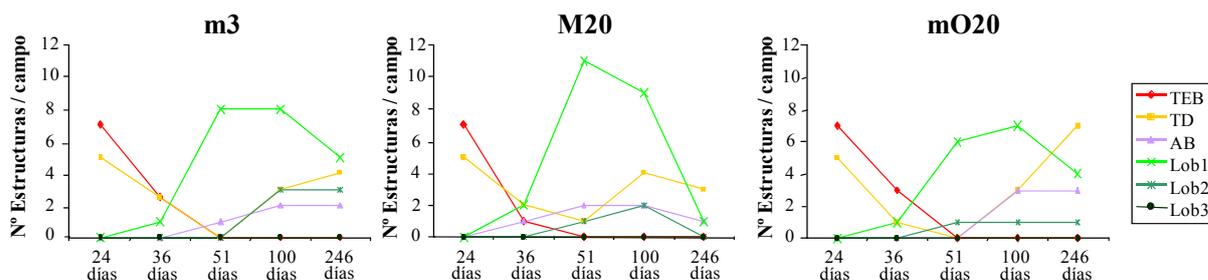
Para el análisis morfológico de la glándula mamaria se identificaron las distintas estructuras epiteliales normales indiferenciadas (TEB y TD) y lobulares (AB y lobulillos tipo 1, 2 y 3) en el área marginal de las glándulas mamarias abdominales (Figura 36).



**Figura 36. Identificación de las distintas estructuras epiteliales normales en glándula mamaria.** TEB: Yemas Terminales (Terminal End Bud); TD: Ductos Terminales (Terminal Duct); AB: Yemas alveolares (Alveolar Bud); Lob 1, 2 y 3: Lóbulos tipo 1, 2 y 3. Imágenes captadas a 400X.

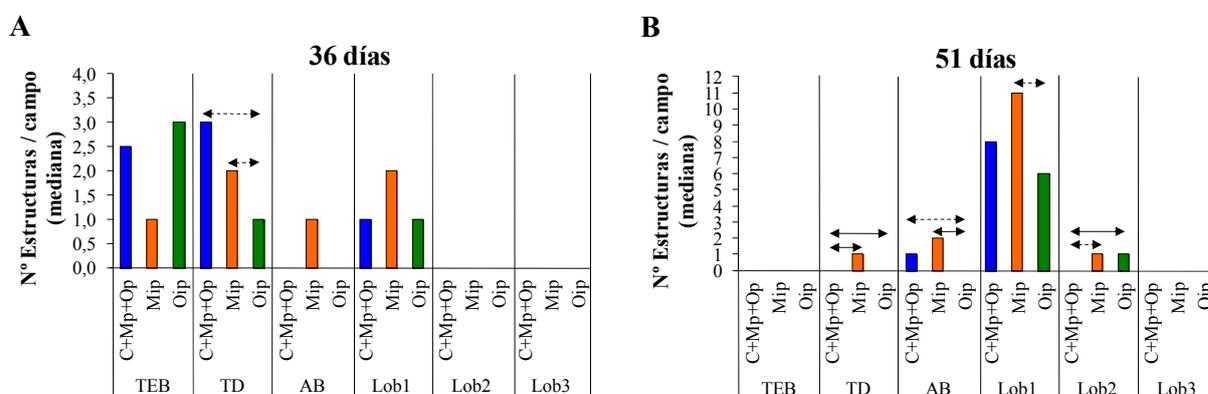
El estudio cuantitativo de las diferentes estructuras a lo largo del tiempo mostró un desarrollo de la glándula mamaria similar en todos los grupos (Figura 37). A los 24 días solamente se observaron estructuras indiferenciadas (TEB y TD). El número de TEBs disminuyó progresivamente a los 36, 51 y 100 días, y al final del estudio (246 días) no se encontraron este tipo de estructuras. En cuanto a los TDs, su presencia se fue reduciendo hasta los 51 días para, posteriormente, volver a aumentar en edades post-inducción.

Las estructuras alveolares aparecieron a los 36 días de edad y su número fue aumentando hasta los 100 días. Por lo que se refiere a las estructuras lobulares, el número de lóbulos tipo 1 fue elevado entre los 51 y 100 días, y disminuyó al final del estudio; mientras que los de tipo 2 aparecieron a los 36 días y su presencia fue en aumento hasta los 100 días. Por último, se observó un pequeño número de lóbulos tipo 3 a los 100 días y al final del estudio.



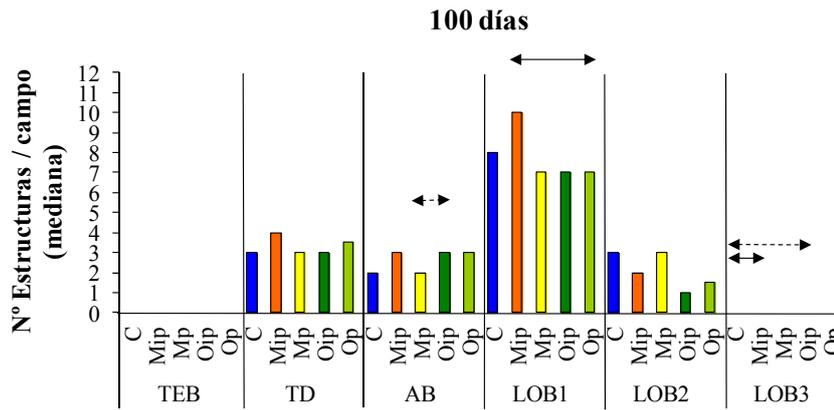
**Figura 37. Número de estructuras epiteliales normales de la glándula mamaria a lo largo del tiempo.** 36 y 51 días: dieta m3 (grupos C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>), M20 (grupo M<sub>IP</sub>), mO20 (grupo O<sub>IP</sub>); 100 y 246 días: m3 (grupo C), M20 (grupos M<sub>IP</sub>+M<sub>P</sub>), mO20 (grupos O<sub>IP</sub>+O<sub>P</sub>). TEB: Yemas Terminales (Terminal End Bud); TD: Ductos Terminales (Terminal Duct); AB: Yemas alveolares (Alveolar Bud); Lob 1, 2 y 3: Lóbulos tipo 1, 2 y 3.

El análisis comparativo de las estructuras epiteliales entre los distintos grupos experimentales mostró a los 36 días de edad un número mayor de TDs en los grupos control y M<sub>IP</sub> respecto al O<sub>IP</sub> (Figura 38A y Anexo Tabla 14). En cambio, a los 51 días, los grupos alimentados con dieta hiperlipídica (M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub>) presentaron un número significativamente mayor de TDs; M<sub>IP</sub> y control presentaron más estructuras alveolares que O<sub>IP</sub>; en M<sub>IP</sub> se observaron más lóbulos tipo 1 que en O<sub>IP</sub>; y las dos dietas hiperlipídicas tuvieron más cantidad de estructuras lobulares tipo 2 que el grupo control (Figura 38B y Anexo Tabla 15).



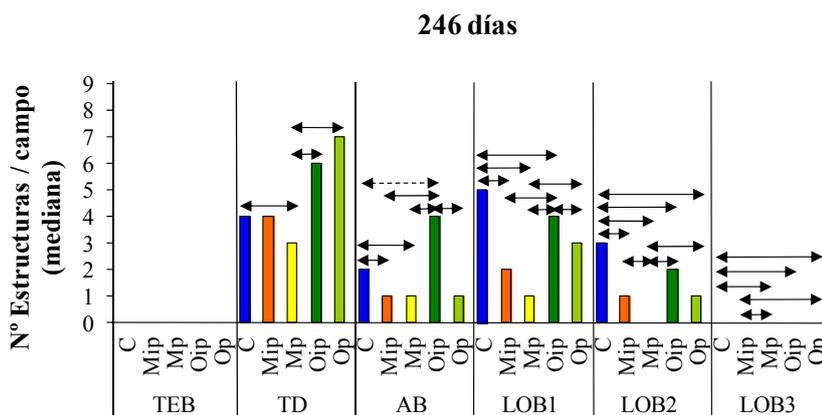
**Figura 38. Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 36 y 51 días.** TEB: Yemas Terminales (Terminal End Bud); TD: Ductos Terminales (Terminal Duct); AB: Yemas alveolares (Alveolar Bud); Lob 1, 2 y 3: Lóbulos tipo 1, 2 y 3. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

A los 100 días se observaron pocas diferencias entre grupos. En concreto, el grupo O<sub>IP</sub> presentó más estructuras alveolares que M<sub>P</sub>; a la vez que M<sub>IP</sub> mostró más lóbulos tipo 1 que O<sub>P</sub>. En cuanto a los lóbulos tipo 3, estos fueron más abundantes en los grupos de dieta hiperlipídica M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> respecto al control (Figura 39 y Anexo Tabla 16).



**Figura 39. Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 100 días.** TEB: Yemas Terminales (Terminal End Bud); TD: Ductos Terminales (Terminal Duct); AB: Yemas alveolares (Alveolar Bud); Lob 1, 2 y 3: Lóbulos tipo 1, 2 y 3. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

Al final del estudio (246 días de edad), cabe destacar que no se encontraron TEB en la glándula mamaria de los diferentes grupos experimentales. Los resultados obtenidos y las diferencias entre grupos se encuentran detallados en la Figura 40 y en el Anexo Tabla 17. El número de TD disminuyó en el grupo  $M_p$  respecto al control y a los alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de oliva. En cuanto al número de AB, éste disminuyó en los grupos  $M_{IP}$  y  $M_p$ , y aumentó en el  $O_{IP}$ . En relación a las estructuras lobulillares, en general, se observó que el número de Lob1, Lob2 y Lob3 fue superior en el grupo control, mientras que los valores más bajos correspondieron a los grupos  $M_{IP}$  y  $M_p$ . Los grupos  $O_{IP}$  y  $O_p$  presentaron valores intermedios.



**Figura 40. Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días.** TEB: Yemas Terminales (Terminal End Bud); TD: Ductos Terminales (Terminal Duct); AB: Yemas alveolares (Alveolar Bud); Lob 1, 2 y 3: Lóbulos tipo 1, 2 y 3. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 4.1.2. Densidad de la Glándula Mamaria.

La comparación entre grupos de la categorización cualitativa de las glándulas mamarias (Tabla 10), prácticamente no mostró diferencias hasta los 100 días. A esa edad, las glándulas fueron más densas en los grupos de dieta hiperlipídica (excepto O<sub>P</sub>) que en el control. Al final del estudio las glándulas mamarias más densas fueron las de los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> (clases III y IV). En cambio, los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>, apenas presentaron glándulas mamarias de elevada densidad epitelial (clases III y IV) y además fueron similares a las del control e incluso de menos densidad glandular (elevado porcentaje en la clase I).

A pesar de las diferencias observadas, el análisis estadístico cualitativo no mostró diferencias significativas entre grupos en las distintas edades. Únicamente se pudo analizar los valores obtenidos al final del estudio debido a la naturaleza de los datos en las edades intermedias (Tabla 11).

**Tabla 10. Categorización cualitativa de la glándula mamaria en función de la densidad estructural.**

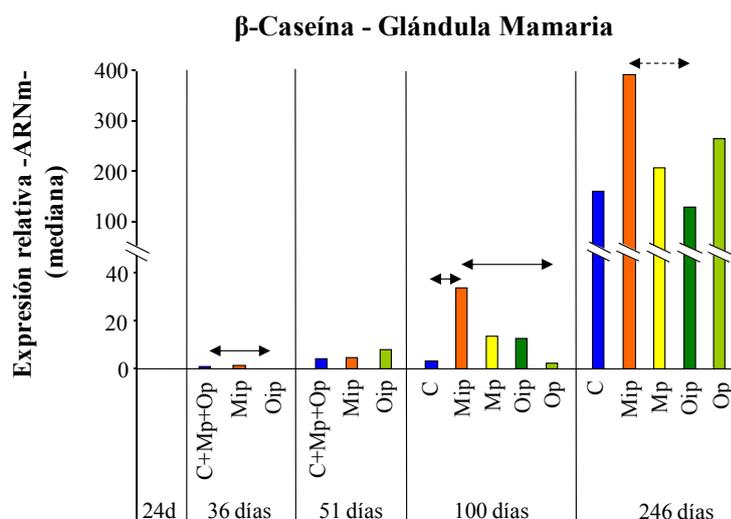
Grupo / Clase	I	II	III	IV
<b>24 días</b>	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0%)
<b>36 días</b>				
C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)
M <sub>IP</sub>	0 (0%)	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)
O <sub>IP</sub>	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
<b>51 días</b>				
C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	0 (0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0%)
M <sub>IP</sub>	0 (0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0%)
O <sub>IP</sub>	0 (0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0%)
<b>100 días</b>				
C	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
M <sub>IP</sub>	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0%)
M <sub>P</sub>	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0%)
O <sub>IP</sub>	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
O <sub>P</sub>	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>246 días</b>				
C	3 (27.3%)	6 (54.6%)	1 (9.1%)	1 (9.1%)
M <sub>IP</sub>	1 (8.3%)	7 (58.3%)	3 (25%)	1 (8.3%)
M <sub>P</sub>	2 (16.7%)	6 (50%)	3 (25%)	1 (8.3%)
O <sub>IP</sub>	4 (36.4%)	7 (63.7%)	0 (0%)	0(0%)
O <sub>P</sub>	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	0 (0%)

Grupos comparados	$\chi^2$ Observada	$\chi^2$ Teórica	Significación
C/M <sub>IP</sub>	2	7.81	NS
C/M <sub>P</sub>	1	7.81	NS
C/O <sub>IP</sub>	2	7.81	NS
C/O <sub>P</sub>	2	7.81	NS
M <sub>IP</sub> /M <sub>P</sub>	0	7.81	NS
M <sub>IP</sub> /O <sub>IP</sub>	6	7.81	NS
M <sub>IP</sub> /O <sub>P</sub>	5	7.81	NS
M <sub>P</sub> /O <sub>IP</sub>	5	7.81	NS
M <sub>P</sub> /O <sub>P</sub>	4	7.81	NS
O <sub>IP</sub> /O <sub>P</sub>	2	7.81	NS

**Tabla 11. Análisis estadístico del grado de densidad de la glándula mamaria de todos los grupos experimentales.**  $\chi^2$ : test ji-cuadrado. NS: diferencias no significativas.

#### 4.2. Diferenciación Molecular de la Glándula Mamaria.

La expresión génica del marcador de diferenciación  $\beta$ -Caseína en glándula mamaria se estudió por PCR a tiempo real (Figura 41 y Anexo Tabla 18). Los niveles de ARNm de este gen aumentaron a lo largo del tiempo en todos los grupos. A los 36 días de edad, su expresión relativa fue significativamente superior en el grupo control (C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>) respecto O<sub>IP</sub>. M<sub>IP</sub> presentó niveles superiores respecto el grupo control y O<sub>P</sub> ( $p < 0.05$ ) a los 100 días y respecto al grupo O<sub>IP</sub> ( $0.05 < p < 0.1$ ) al final del estudio.



**Figura 41. Expresión relativa del ARNm de  $\beta$ -Caseína en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

Por otra parte, se correlacionaron los valores de expresión relativa de este gen con diferentes parámetros morfológicos de glándula mamaria: número de cada una de las estructuras epiteliales estudiadas por campo; número de estructuras indiferenciadas (TEB+TD) por campo; número de estructuras lobulares (Lob1+Lob2+Lob3) por campo; número de estructuras diferenciadas (AB+estructuras lobulares) por campo. En ningún caso se encontraron correlaciones significativas (datos no mostrados).

Asimismo, se correlacionaron los valores de expresión relativa de este gen con el grado de densidad de la glándula mamaria en los grupos experimentales a lo largo del estudio. Los resultados mostraron que ambos parámetros se correlacionaban de forma positiva, fundamentalmente en el grupo M<sub>IP</sub> en todas las edades, a excepción de los 51 días de edad, y en el grupo control a los 36 días y al final del estudio (Tabla 12).

**Tabla 12. Correlación entre los niveles de expresión de  $\beta$ -Caseína y el grado de densidad en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** a: correlación no paramétrica. NS: diferencias no significativas.

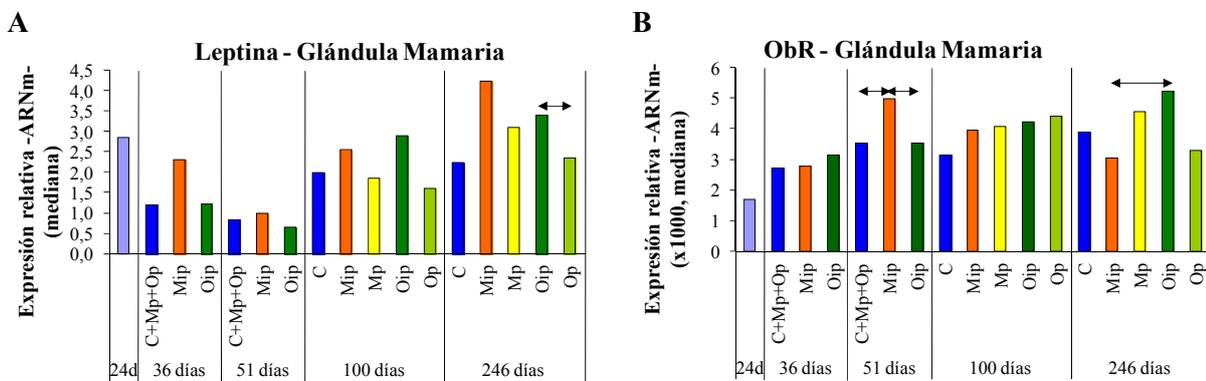
Edad	Grupo	n	Tau-b de Kendall <sup>a</sup>	
			R	Significación
36 días	C	3	1.000	p<0.05
	M <sub>IP</sub>	3	1.000	p<0.05
	O <sub>IP</sub>	3	0.000	NS
51 días	C	3	0.816	NS
	M <sub>IP</sub>	3	0.816	NS
	O <sub>IP</sub>	3	0.333	NS
100 días	C	3	0.816	NS
	M <sub>IP</sub>	3	1.000	p<0.05
	M <sub>P</sub>	3	0.333	NS
	O <sub>IP</sub>	3	0.816	NS
	O <sub>P</sub>	3	0.816	NS
246 días	C	8	0.591	0.1<p<0.05
	M <sub>IP</sub>	11	0.744	p<0.05
	M <sub>P</sub>	9	0.365	NS
	O <sub>IP</sub>	8	-0.197	NS
	O <sub>P</sub>	9	0.452	NS

### 4.3. Hormonas y Receptores relacionados con Lípidos y Desarrollo de la Glándula Mamaria.

La glándula mamaria está estrechamente regulada por una serie de moléculas íntimamente relacionadas con el tejido adiposo y el metabolismo en general, como son la Leptina y su receptor, el Receptor Activado de Proliferación de Peroxisomas tipo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) y la Adiponectina. Asimismo, dichas moléculas están implicadas en el desarrollo de la carcinogénesis. Por esta razón fueron analizadas en glándula y adenocarcinoma mamario. A continuación se presentan los resultados obtenidos en el estudio realizado en glándula.

#### 4.3.1. Leptina y su Receptor.

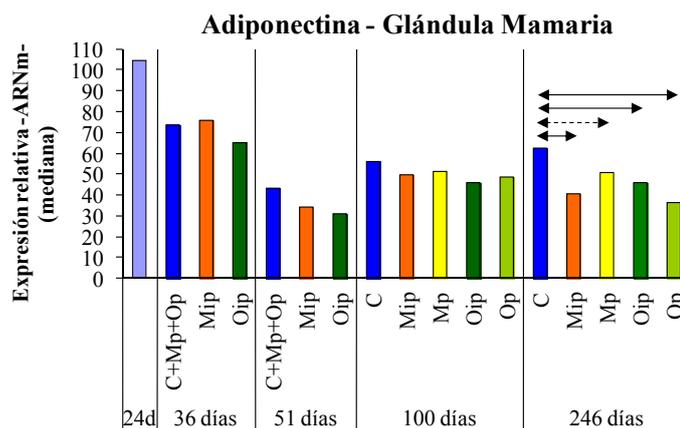
La Figura 42 y el Anexo Tabla 19 muestran los resultados del estudio de la expresión de la hormona adipocitaria Leptina y su receptor (ObR) en glándula mamaria. En general se observaron pocas diferencias significativas entre los distintos grupos a lo largo del estudio. Únicamente el grupo O<sub>IP</sub> presentó una mayor expresión de Leptina respecto O<sub>P</sub> a los 246 días. M<sub>IP</sub> mostró a los 51 días, niveles más elevados de ObR respecto el grupo control y O<sub>IP</sub>, mientras que al final del estudio expresó niveles inferiores respecto a este último grupo.



**Figura 42. Expresión relativa del ARNm de Leptina (A) y su receptor (B) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 4.3.2. Adiponectina.

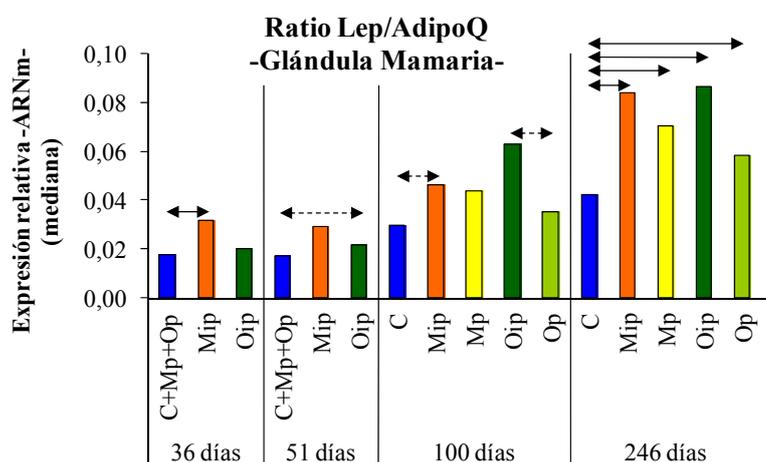
El análisis de la hormona metabólica Adiponectina, implicada en la oxidación de los ácidos grasos, mostró un aumento en el control respecto los grupos de dieta hiperlipídica al final del estudio (Figura 43 y Anexo Tabla 20).



**Figura 43. Expresión relativa del ARNm de Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 4.3.3. Relación Leptina y Adiponectina.

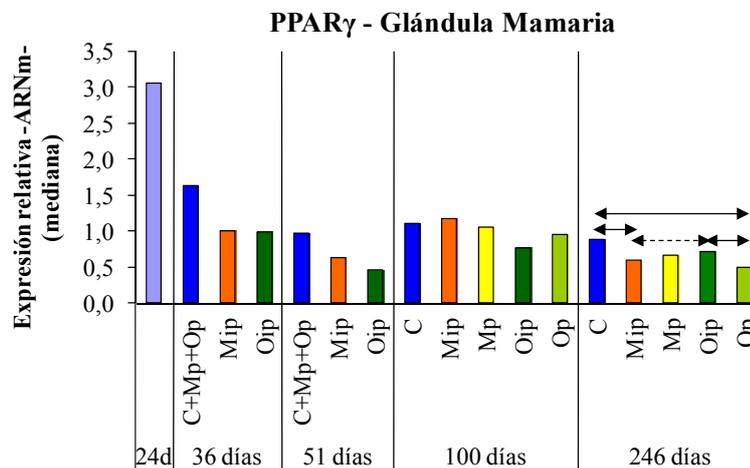
El análisis de la relación entre la expresión del ARNm de Leptina y de Adiponectina reveló una mayor proporción entre ambas adipoquinas en los grupos de dieta hiperlipídica respecto al grupo control a lo largo del estudio, aunque únicamente de forma significativa en el grupo M<sub>IP</sub> a los 36 días de edad y en todos los grupos al final del estudio (Figura 44 y Anexo Tabla 21).



**Figura 44. Relación entre la expresión relativa del ARNm de Leptina y Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** Lep: Leptina. AdipoQ: Adiponectina. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 4.3.4. Receptor Activado de Proliferación de Peroxisomas tipo $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ).

En el estudio de la expresión en glándula mamaria del receptor PPAR $\gamma$ , solamente se observaron diferencias significativas a los 246 días, donde los grupos control y O<sub>IP</sub> presentaron una mayor expresión de dicho receptor respecto a M<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> (Figura 45 y Anexo Tabla 22).



**Figura 45. Expresión relativa del ARNm de PPAR $\gamma$  en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24d: 24 días. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

## B. CARCINOGENESIS.

### 1. PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS.

#### 1.1. Clasificación Histopatológica.

El diagnóstico histopatológico de las afecciones que presentaron los animales se basó en los exámenes anatomopatológicos de las biopsias de órganos, nódulos u otras estructuras que en el momento de la necropsia aparecieron como anormales por su aspecto o tamaño.

Las afecciones mamarias se clasificaron en función de los distintos tipos histológicos como patología maligna y benigna. Dentro de la patología mamaria benigna se consideraron diferentes tipos de lesiones, ya que algunas de ellas pueden evolucionar desfavorablemente (Tabla 13). Asimismo, también se encontraron carcinomas escamosos, como patología neoplásica no mamaria maligna, en los distintos grupos experimentales: 2 en C, 1 en M<sub>IP</sub>, 8 en O<sub>IP</sub> y 2 en O<sub>P</sub>. Ninguno de los animales del grupo M<sub>P</sub> presentó este tipo de patología.

Tabla 13. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio.

	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA MALIGNA</b>					
Adenocarcinomas	46	100	87	58	82
<b>PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA BENIGNA</b>					
<b>Neoplásica</b>					
Adenoma	1	4	8	7	7
Fibroma	2	2	2	1	2
Fibroadenoma	1	9	9	6	10
Otras					
<i>Papiloma</i>	1	1	-	-	-
<i>Lipoma</i>	-	1	2	-	-
<i>Fibrolipoma</i>	-	1	-	-	-
<i>Hemangioma</i>	1	-	-	-	-
<i>Linfangioma</i>	-	-	1	-	-
<b>Otras lesiones</b>					
<b>Quísticas</b>					
<i>Ductal</i>	-	-	-	2	1
<i>Epidérmica</i>	2	5	1	-	2
<b>No quísticas</b>					
<i>Hiperplasia lobulillar</i>	1	5	4	2	3
<i>Mastopatía</i>	1	1	3	-	1
<i>Fibrosis</i>	-	-	6	1	1

## 1.2. Grado Histopatológico de los Tumores Mamarios.

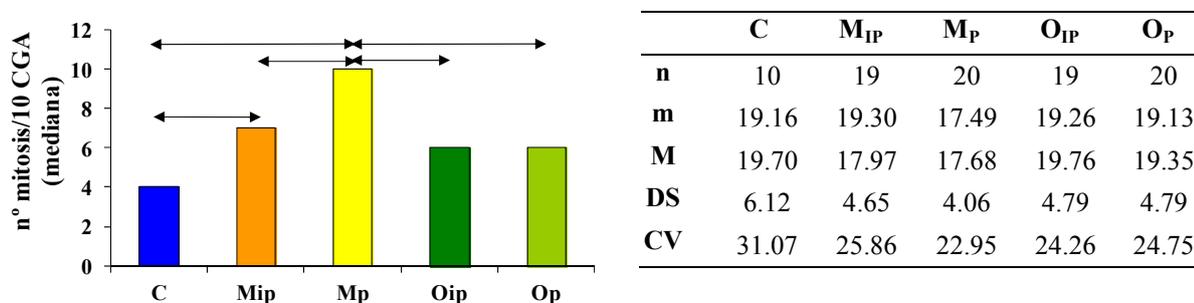
Además del diagnóstico, también se efectuó el estudio de las características histopatológicas de los adenocarcinomas mamarios de los distintos grupos experimentales. Se constató que los carcinomas adoptaron un patrón mixto cribiforme/papilar, con predominio del cribiforme en los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> y mayor porcentaje del papilar en O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> respecto a estos grupos. Se analizó el grado arquitectural y nuclear como expresión de su diferenciación morfológica y el número de mitosis en 10 campos de gran aumento como muestra de la capacidad proliferativa (Tabla 14 y Figura 46). El número de mitosis se presenta agrupado en categorías y en valor absoluto.

En cuanto al grado histológico de los adenocarcinomas mamarios, los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz, M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>, mostraron el mayor porcentaje de tumores con grados arquitectural y nuclear II y III, mientras que los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> presentaron el mayor número de tumores con grado I, de forma similar al control. Además, los tumores del grupo M<sub>P</sub> destacaron por presentar una elevada actividad mitótica, seguidos de los tumores del grupo M<sub>IP</sub>, respecto al

resto de grupos experimentales. Los tumores de los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>, mostraron una menor actividad mitótica, más similar al control.

**Tabla 14. Características histopatológicas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio (I).**

	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>Grado arquitectural</b>					
I	18 (38.3%)	23 (23%)	17 (20%)	18 (34.6%)	35 (41.7%)
II	20 (42.6%)	55 (55%)	50 (58.8%)	27 (51.9%)	29 (34.5%)
III	9 (19.1%)	22 (22%)	18 (21.2%)	7 (13.5%)	20 (23.8%)
<b>Grado nuclear</b>					
I	10 (21.4%)	6 (6%)	2 (2.3%)	4 (7.7%)	16 (19.1%)
II	29 (61.6%)	52 (52%)	40 (47.1%)	34 (65.4%)	39 (46.4%)
III	8 (17%)	42 (42%)	43 (50.6%)	14 (26.9%)	29 (34.5%)
<b>Número de mitosis</b>					
≤ 3	22 (46.8%)	27 (27%)	16 (18.8%)	17 (32.7%)	30 (35.7%)
4-6	9 (19.1%)	20 (20%)	12 (14.1%)	10 (19.2%)	15 (17.9%)
7-9	7 (14.9%)	13 (13%)	14 (16.5%)	9 (17.3%)	9 (10.7%)
10-19	7 (14.9%)	29 (29%)	33 (38.8%)	13 (25%)	20 (23.8%)
≥ 20	2 (4.3%)	11 (11%)	10 (11.8%)	3 (5.8%)	10 (11.9%)



**Figura 46. Número de mitosis en 10 campos de gran aumento (400X).** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla 15 se muestran otras características histopatológicas estudiadas de los adenocarcinomas mamarios. Los grupos experimentales alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz presentaron una mayor reactividad estromal respecto al resto de grupos, aunque únicamente las diferencias fueron significativas en el grupo M<sub>P</sub> respecto a O<sub>P</sub>. Asimismo, se observó una necrosis tumoral significativamente mayor en los adenocarcinomas del grupo M<sub>P</sub> respecto al resto de grupos experimentales. Por las características del test estadístico realizado, no

se pudieron analizar las comparaciones donde el valor de alguna categoría era igual a cero (entre el control y los grupos de aceite de oliva, así como entre O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>).

**Tabla 15. Características histopatológicas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio (II).**

	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>Reacción Estromal</b>					
-	4 (6.6%)	5 (4.9%)	6 (7%)	1 (1.9%)	3 (3.5%)
+	14 (23.3%)	19 (18.8%)	22 (25.9%)	13 (24.5%)	19 (22.3%)
++	33 (55%)	52 (51.5%)	37 (43.5%)	33 (62.3%)	54 (63.5%)
+++	9 (15%)	25 (24.7%)	20 (23.5%)	6 (11.3%)	9 (10.6%)
<b>Necrosis Tumoral</b>					
No	57	97	70	50	83
Focal	3	3	6	3	2
Extensa	0	1	9	0	0

A partir de estos datos se determinó el grado histológico de malignidad de los adenocarcinomas mamarios basado en el método Scarff-Bloom-Richardson adaptado a la rata ([4264]) (Tabla 16 y Figura 47). Así, los tumores de los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> fueron los que mostraron mayor agresividad histológica y actividad mitótica, mientras que los tumores de los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> presentaron características histopatológicas compatibles con una menor malignidad, similares a los del control. En la Figura 48 se puede ver imágenes representativas de los tumores de cada uno de los grupos experimentales.

**Tabla 16. Distribución de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio según el índice Scarff-Bloom-Richardson.**

Grados	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>3</b>	6 (12.8%)	6 (6%)	2 (2.4%)	3 (5.8%)	11 (13.1%)
<b>4</b>	8 (17%)	11 (11%)	10 (11.8%)	10 (19.2%)	11 (13.1%)
<b>5</b>	13 (27.7%)	6 (6%)	5 (5.9%)	6 (11.5%)	13 (15.5%)
<b>6</b>	3 (6.4%)	20 (20%)	12 (14.1%)	6 (11.5%)	7 (8.3%)
<b>7</b>	4 (8.5%)	10 (10%)	8 (9.4%)	8 (15.4%)	8 (9.5%)
<b>8</b>	7 (14.9%)	14 (14%)	9 (10.6%)	8 (15.4%)	13 (15.5%)
<b>9</b>	2 (4.3%)	20 (20%)	20 (23.5%)	8 (15.4%)	8 (9.5%)
<b>10</b>	3 (6.4%)	10 (10%)	14 (16.5%)	2 (3.9%)	8 (9.5%)
<b>11</b>	1 (2.1%)	3 (3%)	5 (5.9%)	1 (1.9%)	5 (6%)

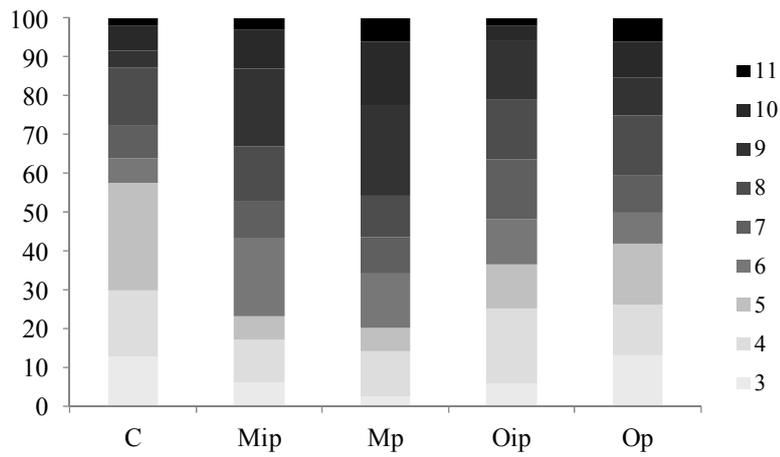


Figura 47. Distribución de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales al final del estudio según el índice Scarff-Bloom-Richardson.

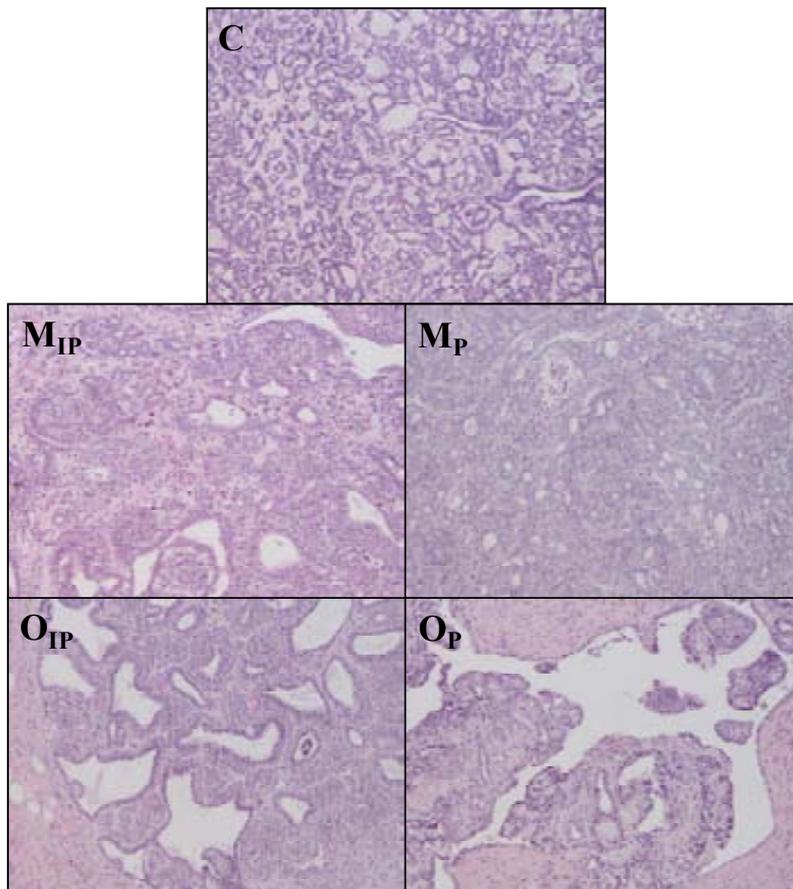


Figura 48. Imágenes histológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. Aumento 200X.

## 2. PARÁMETROS CLÍNICOS.

### 2.1. Tiempo de Latencia.

El análisis del tiempo de latencia de los tumores se caracterizó de tres formas diferentes. En primer lugar, se consideró el tiempo de aparición del primer tumor del grupo. Éste fue anterior en todos los grupos de dieta hiperlipídica, excepto en el grupo O<sub>P</sub> donde fue igual al control (Tabla 17).

**Tabla 17. Tiempo de aparición del primer tumor de los diferentes grupos experimentales.**

	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
t	52	20	20	33	52
N	6	1	1	3	6

t: tiempo de latencia (tiempo post-inducción), días. N: número de palpación de la primera afectación.

En segundo lugar, se estudió el tiempo medio de latencia de los animales afectados (Tabla 18). Dicho parámetro se define como:

$$L_k = 1/n \sum_{i=1}^n t_i$$

siendo “n” el número de ratas afectadas dentro de un grupo experimental, y “t<sub>i</sub>” el tiempo en el que aparece por primera vez la patología mamaria maligna en la rata “i” del grupo.

Los resultados mostraron que los tumores aparecieron antes en los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz (M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>), posteriormente en los grupos alimentados con aceite de oliva (O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>), y por último en el grupo control. Las diferencias, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas (Tabla 19).

**Tabla 18. Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales.**

	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>n</b>	16	20	20	15	17
<b>m</b>	97	71.5	68	89	89
<b>M</b>	98.6	81.8	76.4	86.4	94.7
<b>DS</b>	47.8	44.2	41.7	40.04	27
<b>CV</b>	203	161.8	163	222.3	318.4

n: número de efectivos. m: mediana (días). M: tiempo medio de latencia (días). DS: desviación estándar (días). CV: coeficiente de variación (%).

**Tabla 19. Análisis estadístico del tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales.**

<b>Grupos comparados</b>	<b>Z</b>	<b>Significación</b>
C/M <sub>IP</sub>	1.198	NS
C/M <sub>P</sub>	1.409	NS
C/O <sub>IP</sub>	0.496	NS
C/O <sub>P</sub>	0.362	NS
M <sub>IP</sub> /M <sub>P</sub>	0.517	NS
M <sub>IP</sub> /O <sub>IP</sub>	0.635	NS
M <sub>IP</sub> /O <sub>P</sub>	1.517	NS
M <sub>P</sub> /O <sub>IP</sub>	0.837	NS
M <sub>P</sub> /O <sub>P</sub>	1.885	0.1>p>0.05
O <sub>IP</sub> /O <sub>P</sub>	0.892	NS

Finalmente, se analizó la distribución de los animales en cada grupo en función del tiempo de la primera aparición de tumores mamarios malignos, agrupando las palpaciones por clases en función del tiempo de la primera aparición de tumores mamarios malignos en cada rata (1 clase = 4 palpaciones). En las Tablas 20 y 21 se muestran los resultados del estudio cualitativo, que no reveló diferencias entre grupos.

**Tabla 20. Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

<b>Clases</b>	<b>I</b> (P1-P4)	<b>II</b> (P5-P8)	<b>III</b> (P9-P12)	<b>IV</b> (P13-P16)	<b>V</b> (P17-P20)	<b>VI</b> (P21-P24)	<b>VII</b> (P25-P27)
<b>C</b>	0 (0%)	5 (31.3%)	2 (12.5%)	6 (37.5%)	0 (0%)	1 (6.3%)	2 (12.5%)
<b>M<sub>IP</sub></b>	3 (15%)	4 (20%)	7 (35%)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
<b>M<sub>P</sub></b>	3 (15%)	6 (30%)	5 (25%)	4 (20%)	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)
<b>O<sub>IP</sub></b>	1 (6.7%)	4 (26.7%)	3 (20%)	6 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6.7%)
<b>O<sub>P</sub></b>	0 (0%)	3 (17.6%)	7 (41.2%)	4 (23.5%)	2 (11.8%)	1 (5.9%)	0 (0%)

P: palpación.

**Tabla 21. Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

Grupos comparados	$\chi^2$ Observada	$\chi^2$ Teórica	Significación
C/M <sub>IP</sub>	8	12.59	NS
C/M <sub>P</sub>	7	12.59	NS
C/O <sub>IP</sub>	3	12.59	NS
C/O <sub>P</sub>	8	12.59	NS
M <sub>IP</sub> /M <sub>P</sub>	3	12.59	NS
M <sub>IP</sub> /O <sub>IP</sub>	5	12.59	NS
M <sub>IP</sub> /O <sub>P</sub>	4	12.59	NS
M <sub>P</sub> /O <sub>IP</sub>	5	12.59	NS
M <sub>P</sub> /O <sub>P</sub>	7	12.59	NS
O <sub>IP</sub> /O <sub>P</sub>	7	12.59	NS

$\chi^2$ : test de la ji-cuadrado. NS: diferencias no significativas.

## 2.2. Incidencia.

La incidencia de afectación se define como el cociente entre el número de animales que presentan uno o más tumores respecto al total de animales del grupo. Su análisis constó de dos partes: 1) el estudio temporal, a partir de los datos observados en las distintas palpaciones, y 2) el estudio puntual, con los datos obtenidos al final del ensayo, en el momento del sacrificio.

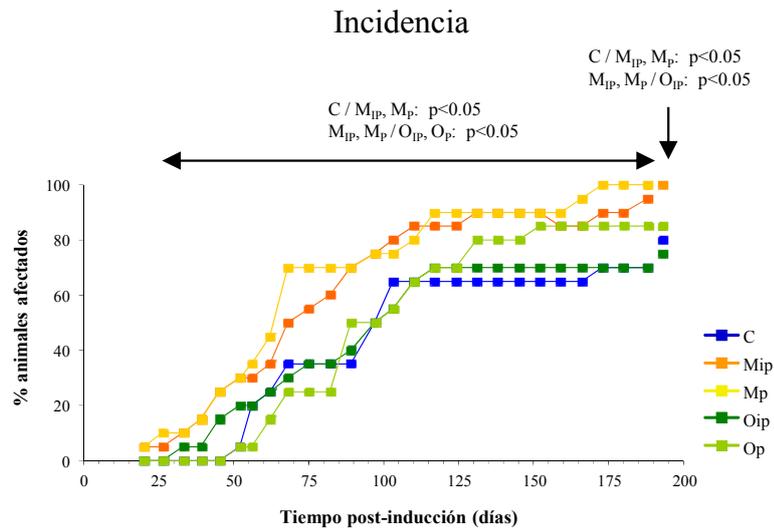
Tal y como se muestra en la Figura 49, la incidencia de animales afectados aumentó durante el estudio en todos los grupos experimentales. Desde el punto de vista cualitativo, la evolución del parámetro mostró que las curvas de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz (M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>) fueron paralelas a las de los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva (O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>) y del grupo control. Sin embargo, la incidencia de los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> se mantuvo por encima del resto de los grupos durante todo el estudio mientras que los valores de incidencia de los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> fluctuaron alrededor del control. Cuantitativamente, el porcentaje de animales afectados fue significativamente superior en los grupos de aceite de maíz (M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>) respecto al control y a los grupos de aceite de oliva (O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>).

En el momento del sacrificio, los grupos de dieta M20 presentaron porcentajes de incidencia significativamente superiores al control y al grupo O<sub>IP</sub>, que presentó un valor de

## Resultados

incidencia intermedio pero más similar a C. El grupo O<sub>P</sub> mostró una incidencia de afectación inferior al control. Los valores obtenidos en este momento fueron los siguientes:

C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
80%	100%	100%	75%	85%
(16/20)	(20/20)	(20/20)	(15/20)	(17/20)



**Figura 49. Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

### 2.3. Contenido Tumoral.

El estudio del contenido tumoral se realizó utilizando dos parámetros:

#### Contenido Tumoral Total (T<sub>j</sub>).

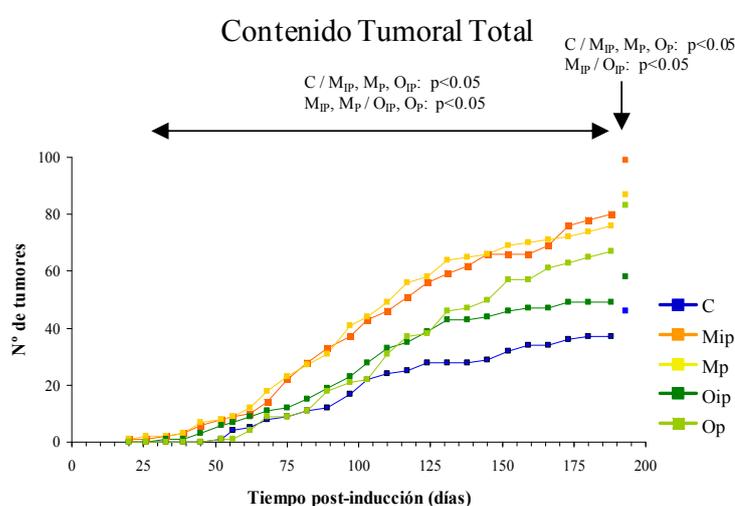
El contenido tumoral total se define como el número total de tumores por grupo experimental. La definición de este parámetro es la siguiente:

$$T_j = \sum_{i=1}^m k_i \quad (\text{tumores / grupo experimental})$$

donde “m” es el número total de ratas dentro del grupo y “k<sub>i</sub>” el total de tumores que posee una rata “i” de ese grupo en la palpación “j”.

El parámetro T puede tener el mismo valor en grupos con distinta incidencia, por lo que la información que proporciona también es parcial. En consecuencia, a fin de realizar una aproximación lo más precisa posible, se estudió dicho parámetro junto con el contenido tumoral medio (K<sub>j</sub>) explicado posteriormente.

El contenido tumoral total aumentó en todos los grupos a lo largo del ensayo (Figura 50). La evolución de las curvas fue similar en los grupos de dietas hiperlipídicas excepto el grupo  $O_{IP}$ , que mostró una evolución más similar a la del grupo control. Durante todo el estudio, los grupos  $M_{IP}$  y  $M_P$  presentaron un número total de tumores significativamente superior al del resto de grupos experimentales. En cambio, los valores de los grupos  $O_{IP}$  y  $O_P$  fueron intermedios, significativamente mayores al control en el caso de  $O_{IP}$ . Este grupo, al igual que el grupo control, tendió a la estabilización del contenido tumoral a partir del día 125 post-inducción. Finalmente, la comparación de este parámetro entre los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz y los de la dieta de aceite de oliva mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 50).



**Figura 50. Contenido Tumoral Total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

En el momento del sacrificio se detectaron diferencias significativas entre los grupos  $M_{IP}$ ,  $M_P$  y  $O_P$  y el control. Asimismo, el contenido tumoral de  $M_{IP}$  fue significativamente superior al del grupo  $O_{IP}$  (Figura 50). El número de tumores obtenido en este momento en cada grupo experimental fue:

C	$M_{IP}$	$M_P$	$O_{IP}$	$O_P$
46	100	87	58	83

### Contenido Tumoral Medio (Kj).

El contenido tumoral medio se define como el número medio de tumores por animal afectado de cada grupo. La definición de este parámetro es la siguiente:

$$K_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n k_i \quad (\text{tumores / animal afectado})$$

donde “n” es el número de ratas cancerosas de un grupo experimental en el día “j” del ensayo, y “k<sub>i</sub>” el total de tumores que posee una rata “i” de ese grupo en ese momento.

El valor medio K constituye un parámetro indicativo de cantidad de tumores, respecto al tiempo, que podría esperarse que tuviera una rata que ha contraído la enfermedad cancerosa por el hecho de pertenecer a un grupo experimental determinado. Dicho parámetro presenta el inconveniente de estar afectado por la dinámica de aparición de tumores en animales no afectados anteriormente, y por tanto sufrir fluctuaciones importantes entre palpaciones.

Por ese motivo, y por los expuestos anteriormente en el contenido tumoral total (Tj), se estudiaron ambos parámetros para dar una idea integral del contenido tumoral.

El contenido tumoral medio aumentó a lo largo del tiempo en todos los grupos experimentales pero el control mostró una línea de evolución estadísticamente inferior a los grupos de dieta hiperlipídica (Figura 51). De todos ellos, O<sub>IP</sub> presentó una evolución intermedia. A lo largo del estudio, los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> mostraron un número de tumores significativamente superior a los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>, mientras que al final del ensayo, únicamente M<sub>IP</sub> fue significativamente superior al control.

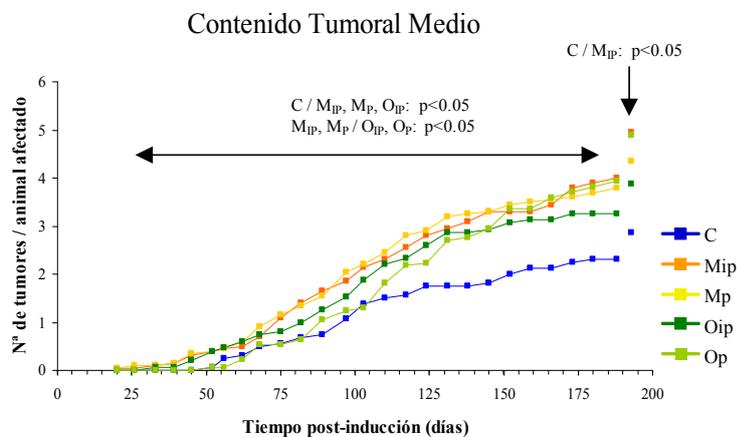


Figura 51. Contenido Tumoral Medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.

## 2.4. Volumen Tumoral.

El análisis de la evolución del volumen tumoral a lo largo del tiempo permite hacer el seguimiento del crecimiento tumoral. El volumen tumoral se calculó a partir de los dos diámetros mayores (D1 y D2) de cada tumor, determinados durante las palpaciones. Se aplicó la fórmula del volumen del elipsoide de revolución:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{D1}{2} \times \left(\frac{D2}{2}\right)^2 \text{ c.c. ; } (D1 > D2)$$

Dado que el momento del sacrificio, el tercer diámetro fue fácilmente calculable, el volumen tumoral en ese momento se determinó a partir del volumen de la elipse. Sin embargo, en las gráficas se siguió el mismo tratamiento que durante las palpaciones, es decir, el cálculo del volumen a partir de los dos diámetros mayores, a fin de que la representación fuese homogénea.

Para el estudio del volumen tumoral se utilizaron 3 parámetros: 1) el volumen tumoral total del grupo ["V" c.c.], 2) el volumen tumoral medio por animal afectado del grupo ["V<sub>A</sub>" c.c./animal], 3) el volumen medio por tumor del grupo ["V<sub>K</sub>" c.c./tumor]. Los dos primeros tienen las mismas ventajas e inconvenientes que el contenido tumoral total y el contenido tumoral medio. V<sub>K</sub> presenta el problema de ser mucho más variable que los otros dos. Sin embargo, la utilización conjunta de los tres parámetros proporcionó una buena aproximación al estudio del tamaño tumoral y a su evolución temporal.

### Volumen Tumoral Total (V).

La expresión matemática del volumen tumoral total es la siguiente:

Si "k<sub>a</sub>" es el número de tumores de un animal "a", el volumen tumoral total "V" de ese animal vendrá expresado por:

$$v_a = \sum_{i=1}^{k_a} V I_i \text{ c.c.}$$

Si "n" es el número de ratas afectadas de un grupo experimental que existen en una palpación "j" del ensayo, el volumen tumoral total del grupo -V<sub>j</sub>- se define como:

$$V_j = \sum_{a=1}^n v_a \text{ c.c.}$$

El momento del sacrificio no se puede analizar estadísticamente este parámetro porque solo existe un dato por grupo. Sin embargo, la utilización de este parámetro se justifica por el

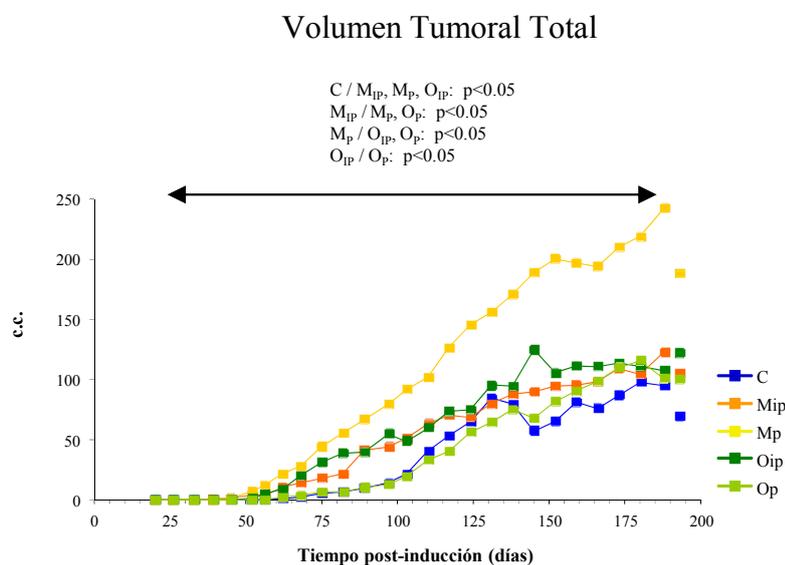
Resultados

hecho de ser independiente de la incidencia y, por tanto, estar libre de oscilaciones debidas a los animales que debutan con tumores.

El análisis de las curvas obtenidas para el volumen tumoral total mostró una evolución claramente diferente del grupo M<sub>P</sub> respecto al resto de grupos, que fueron similares entre ellos (Figura 52). Las comparaciones entre los grupos de las dietas hiperlipídicas indicaron diferencias significativas excepto entre los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub>.

Los resultados del volumen (c.c.) en el momento del sacrificio fueron los siguientes:

C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
69.3	105	188.2	121.9	100.6



**Figura 52. Volumen Tumoral Total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

**Volumen Tumoral Medio por Animal (V<sub>A</sub>).**

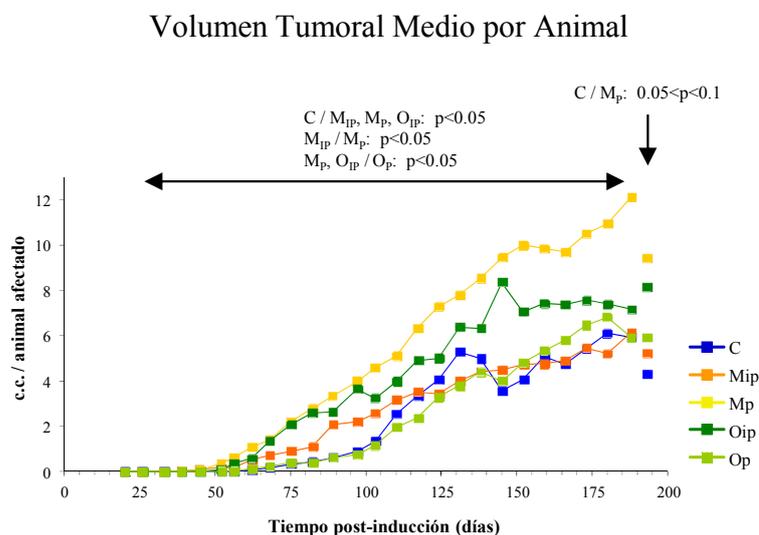
El volumen tumoral medio por animal se define de la siguiente manera:

$$V_A = 1/n \sum_{a=1}^n v_a = (1/n) V \text{ c.c./animal}$$

Los valores de V<sub>A</sub> aumentaron, en general, en todos los grupos experimentales a lo largo del ensayo (Figura 53) siendo M<sub>P</sub> el grupo que presentó una curva de evolución estadísticamente más elevada. Por el contrario el grupo control fue significativamente inferior

a los grupos de dieta hiperlipídica, excepto  $O_P$  que mostró un perfil similar al control. Los grupos  $M_P$  y  $O_{IP}$  presentaron un perfil estadísticamente superior al grupo  $O_P$ .

En el momento del sacrificio, el grupo  $M_P$  mostró un volumen tumoral medio por animal superior al grupo control; dicha diferencia fue cercana a la significación.



**Figura 53. Volumen Tumoral Medio por Animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

### Volumen Medio por Tumor ( $V_K$ ).

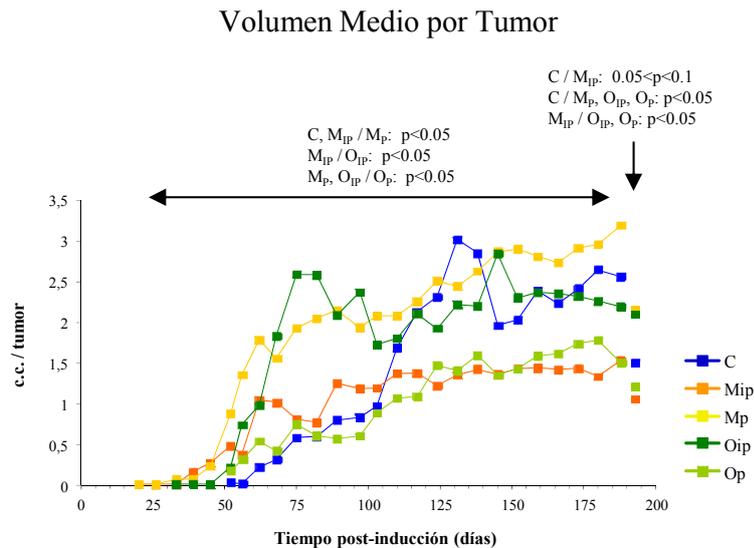
El volumen medio por tumor del grupo vendrá dado por:

$$V_K = 1/K \sum_{a=1}^n v_a = (1/K) V \quad \text{c.c./tumor}$$

donde “K” es el número total de tumores de un grupo experimental que existen en una palpación “j” del ensayo.

Debido a las características de este parámetro, que tal y como se comentó en el caso del contenido tumoral medio, se ve afectado por la aparición de nuevos tumores de volumen pequeño, el volumen medio por tumor presentó bastantes fluctuaciones (Figura 54), sin embargo hubo diferencias significativas de los grupos control y  $M_{IP}$  respecto a  $M_P$ , entre los grupos  $M_{IP}$  y  $O_{IP}$ , y finalmente,  $O_P$  respecto a  $M_P$  y  $O_{IP}$ .

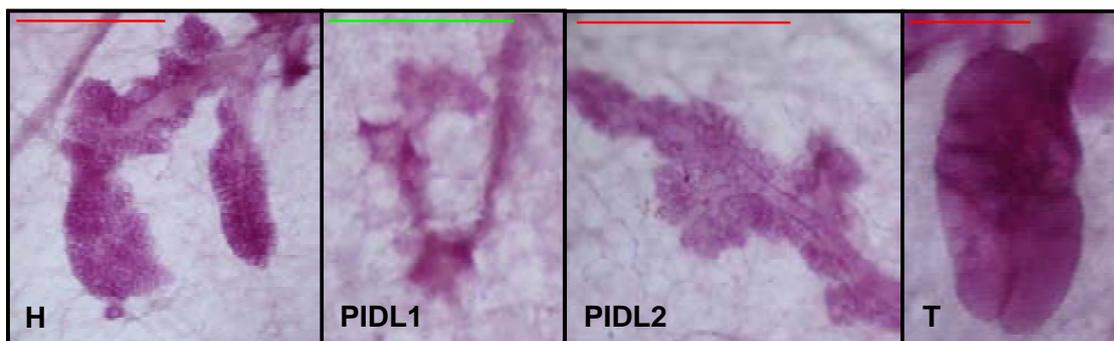
En el momento del sacrificio el grupo control presentó un volumen medio por tumor significativamente inferior a los grupos  $M_P$  y  $O_{IP}$ , sin embargo, dicho volumen fue estadísticamente superior respecto a  $O_P$  y  $M_{IP}$ , en este último caso fue cercano a la significación.



**Figura 54. Volumen Medio por Tumor de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

### 3. ESTUDIO MORFOLÓGICO (*WHOLE MOUNT*) DE LAS ESTRUCTURAS PROLIFERATIVAS ANÓMALAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

El análisis morfológico de la glándula mamaria a partir de las preparaciones *Whole Mount* permitió diferenciar las siguientes estructuras proliferativas anómalas: hiperplasias (H), proliferaciones intra-ductolobulillares (PIDL) tipo 1 y 2, y tumores. (Figura 55).



**Figura 55. Estructuras proliferativas anómalas identificadas en la glándula mamaria de los animales de los diferentes grupos experimentales.** H: hiperplasia; PIDL: proliferación intra-ductolobulillar (tipo 1 y 2); T: tumor. Escala: línea roja = 0.5mm; línea verde = 0.25mm.

Los resultados de este estudio indicaron que a los 100 días de edad el grupo control fue el único que no presentó estructuras proliferativas anómalas. Cabe destacar que a esta edad los tumores se observaron solamente en el grupo alimentado con dieta de aceite de maíz  $M_{ip}$  (Tabla 22).

H	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	PIDL1	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
Campos	33	34	31	37	30	Campos	33	34	31	37	30
Estr.	0	0	0	0	0	Estr.	0	0	1	0	0
m	-	-	-	-	-	m	-	-	1.00	-	-
M	-	-	-	-	-	M	-	-	0.03	-	-
DS	-	-	-	-	-	DS	-	-	0.18	-	-
CV	-	-	-	-	-	CV	-	-	556.77	-	-

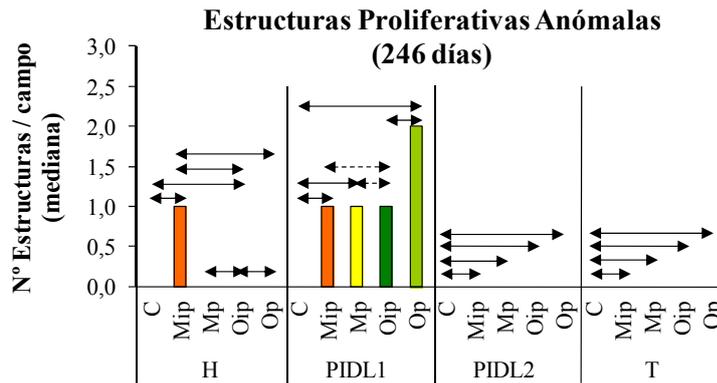
PIDL2	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	T	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
Campos	33	34	31	37	30	Campos	33	34	31	37	30
Estr.	0	2	0	0	1	Estr.	0	3	0	0	0
m	-	0.00	-	-	0.00	m	-	0.00	-	-	-
M	-	0.06	-	-	0.03	M	-	0.09	-	-	-
DS	-	0.34	-	-	0.18	DS	-	0.29	-	-	-
CV	-	583.10	-	-	547.72	CV	-	326.29	-	-	-

**Tabla 22.** Número de las diferentes estructuras proliferativas anómalas por campo de gran aumento (400X) en la glándula mamaria de los diferentes grupos experimentales a los 100 días. H: hiperplasia. PIDL: proliferación intra-ductolobulillar (tipo 1 y 2). T: tumor. Estr.: número de estructuras. m: mediana (n° estructuras/campo). M: media (n° estructuras/campo). DS: desviación estándar (n° estructuras/campo). CV: coeficiente de variación (%). \* p<0.05, \*\* p<0.01.

El número total de estructuras fue muy superior al final del estudio respecto a los 100 días. En la Figura 56 y en el Anexo Tabla 23 se muestran los resultados del análisis morfológico al final del estudio, donde los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>, fueron los de mayor número de hiperplasias, siendo las diferencias estadísticamente significativas en el caso del grupo M<sub>IP</sub> respecto al control y a los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>. Por otra parte, el grupo O<sub>IP</sub> mostró, de forma significativa, el menor número de estructuras hiperplásicas, mientras que el grupo O<sub>P</sub> presentó valores similares al control.

En relación a las proliferaciones intra-ductolobulillares, las de menor medida (PIDL1) fueron más numerosas que las de mayor tamaño (PIDL2) en todos los grupos. En ambos casos, las dietas hiperlipídicas, independientemente del tipo, produjeron un aumento estadísticamente significativo del número de PIDL (Figura 56 y Anexo Tabla 23).

Finalmente, se observó un aumento significativo del número de tumores detectado en el análisis morfológico en los grupos de dieta hiperlipídica, independientemente del tipo, respecto al control, siendo M<sub>IP</sub> el que presentó el mayor número de animales afectados (Figura 56 y Anexo Tabla 23).



**Figura 56. Número de estructuras proliferativas anómalas por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días.** H: Hiperplasias. PIDL: proliferación intra-ductolobulillar (tipo 1 y 2). T: tumor. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

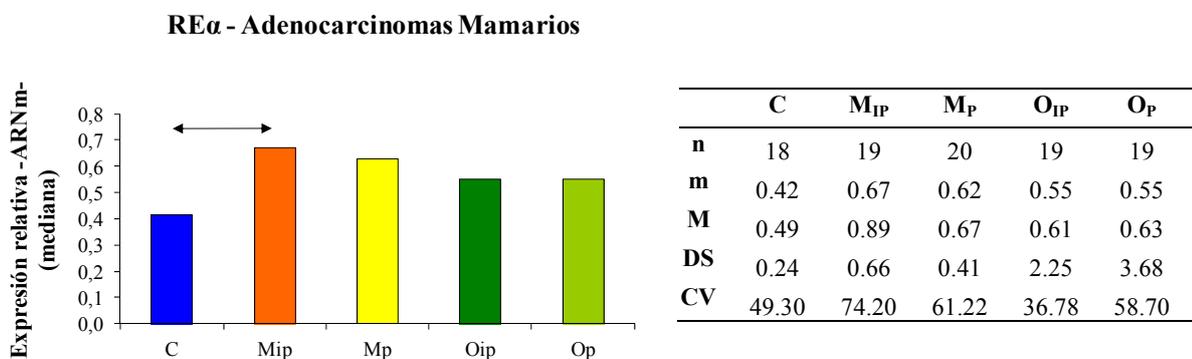
#### 4. RECEPTORES HORMONALES.

##### 4.1. Expresión del ARNm en Adenocarcinomas Mamarios.

Debido a la cantidad disponible de muestras tumorales a los 100 días de edad, solamente se pudo analizar los adenocarcinomas mamarios obtenidos al final del estudio. En consecuencia, todos los resultados de los análisis que se presentan a continuación han sido realizados en muestras obtenidas a la edad de 246 días.

##### 4.1.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ).

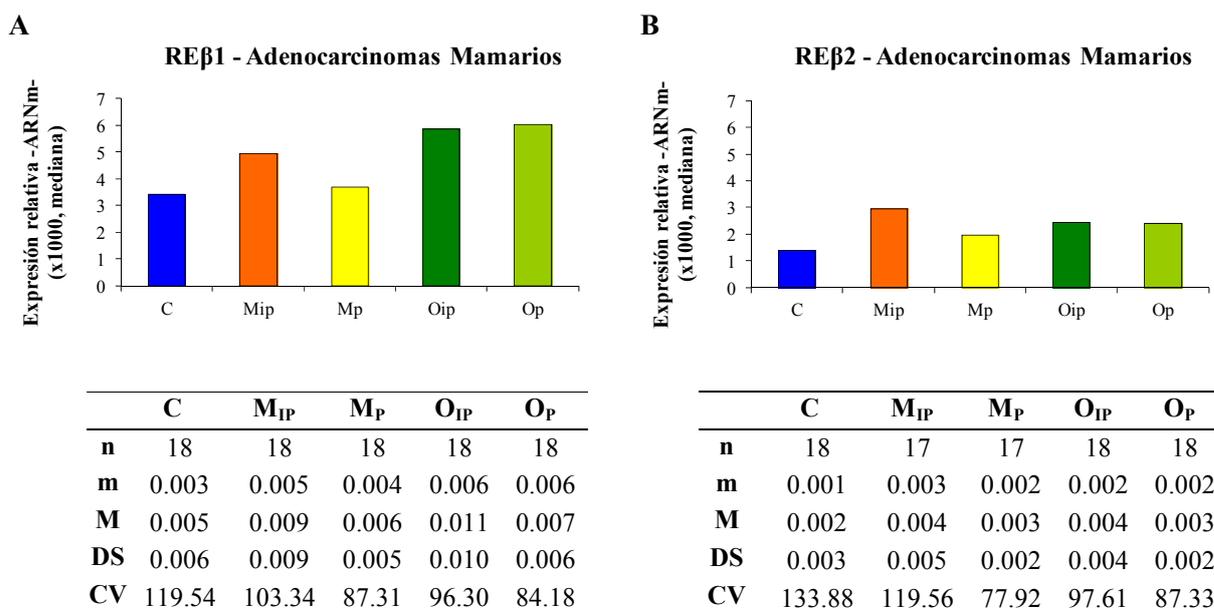
La expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  en los grupos de dieta hiperlipídica, independientemente del tipo, fue superior a la del control. Únicamente en el grupo M<sub>IP</sub> las diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 57).



**Figura 57. Expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.2. Receptor de Estrógenos $\beta 1$ y $\beta 2$ (RE $\beta 1$ y RE $\beta 2$ ).

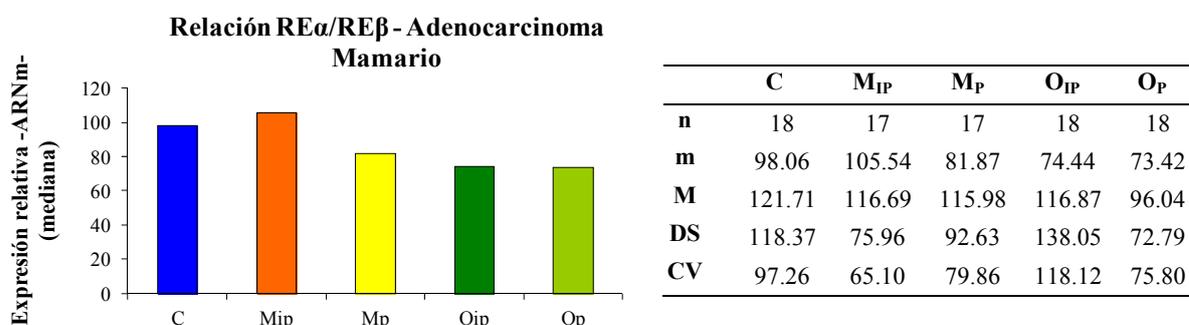
Los tumores, al igual que la glándula mamaria, presentaron niveles de RE $\beta$  inferiores a los de RE $\alpha$ . Tal como se muestran en la Figura 58 todos los grupos experimentales mostraron una expresión relativa de RE $\beta 1$  superiores a los de RE $\beta 2$ , aunque ambas isoformas presentaron un perfil de expresión similar y los niveles no difirieron entre grupos.



**Figura 58.** Expresión relativa del ARNm de RE $\beta 1$  (A) y RE $\beta 2$  (B) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio. n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.3. Relación RE $\alpha$ y RE $\beta$ total.

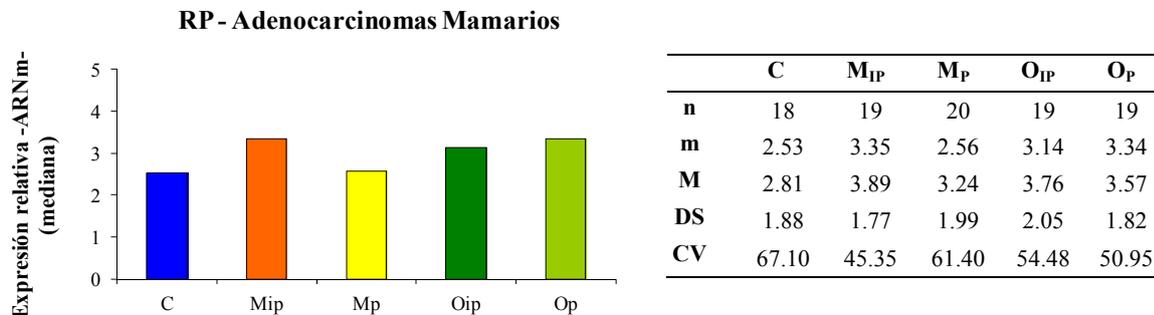
El análisis de la relación entre los niveles de ARNm de RE $\alpha$  y de las dos isoformas del RE $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 59).



**Figura 59.** Relación entre la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.4. Receptor de Progesterona (RP).

Los niveles de RP fueron similares en todos los grupos, sin hallarse diferencias significativas entre ellas (Figura 60).



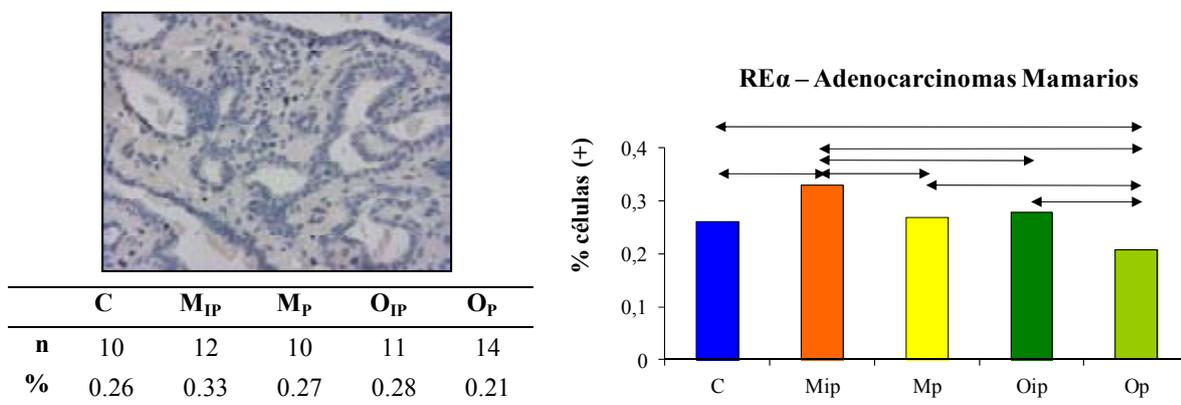
**Figura 60. Expresión relativa del ARNm de RP en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2. Expresión de la Proteína en Adenocarcinomas Mamarios.

El análisis de la expresión proteica de los receptores RE $\alpha$  y RE $\beta$  se realizó mediante inmunohistoquímica, calculando el porcentaje de células marcadas (positivas) respecto las no marcadas en 8 campos de gran aumento (CGA), de la misma manera que en glándula mamaria.

##### 4.2.1. Receptor de Estrógenos $\alpha$ (RE $\alpha$ ).

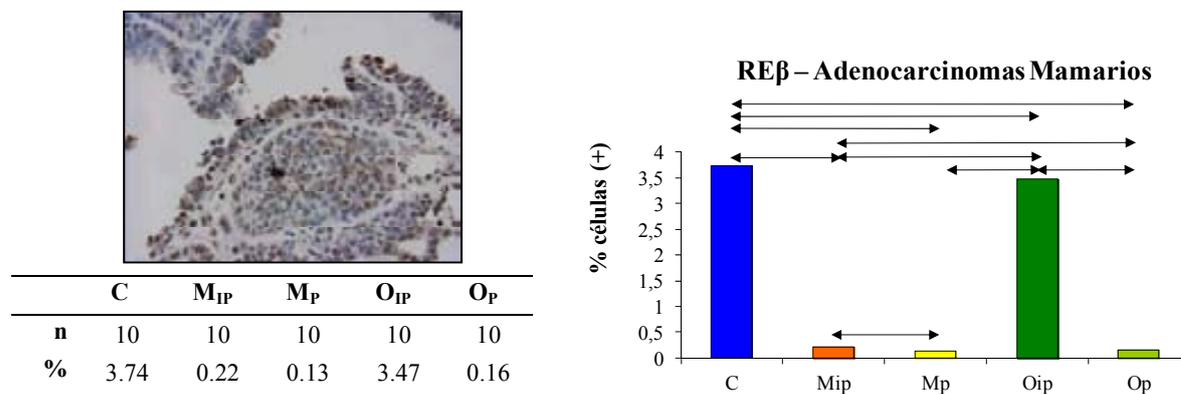
En la Figura 61 se muestran los resultados del estudio de la expresión de RE $\alpha$  en los adenocarcinomas mamarios. El grupo M<sub>IP</sub> mostró un porcentaje de células positivas significativamente mayor respecto al resto de grupos, mientras que O<sub>P</sub> presentó un porcentaje significativamente menor.



**Figura 61. Índice de positividad de RE $\alpha$  en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Se muestra una imagen representativa de la detección del receptor RE $\alpha$  (400X). n: número de efectivos. %: porcentaje de células positivas. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.2. Receptor de Estrógenos $\beta$ (RE $\beta$ ).

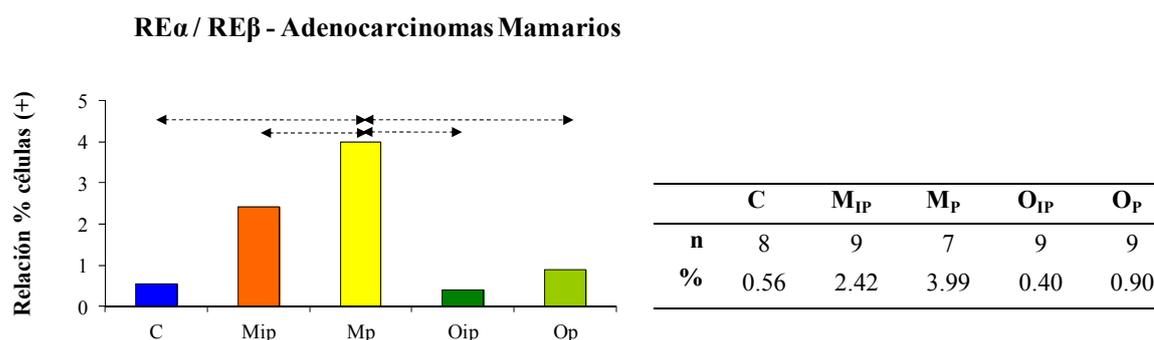
El análisis del receptor RE $\beta$  indicó un porcentaje de células positivas para esta proteína notoriamente superior en los grupos control y O<sub>IP</sub>. En la gráfica (Figura 62) se muestran las diferencias significativas entre grupos.



**Figura 62. Índice de positividad de RE $\beta$  en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Se muestra una imagen representativa de la detección del receptor RE $\beta$  (400X). n: número de efectivos. %: porcentaje de células positivas. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.3. Relación de RE $\alpha$ y RE $\beta$ total.

El análisis de la relación entre la expresión de proteína de RE $\alpha$  y de las dos isoformas del  $\beta$  reveló una mayor proporción del receptor  $\alpha$  respecto al  $\beta$  en los grupos de dieta hiperlipídica M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>; las diferencias encontradas fueron cercanas a la significación (Figura 63).



**Figura 63. Índice de positividad de la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

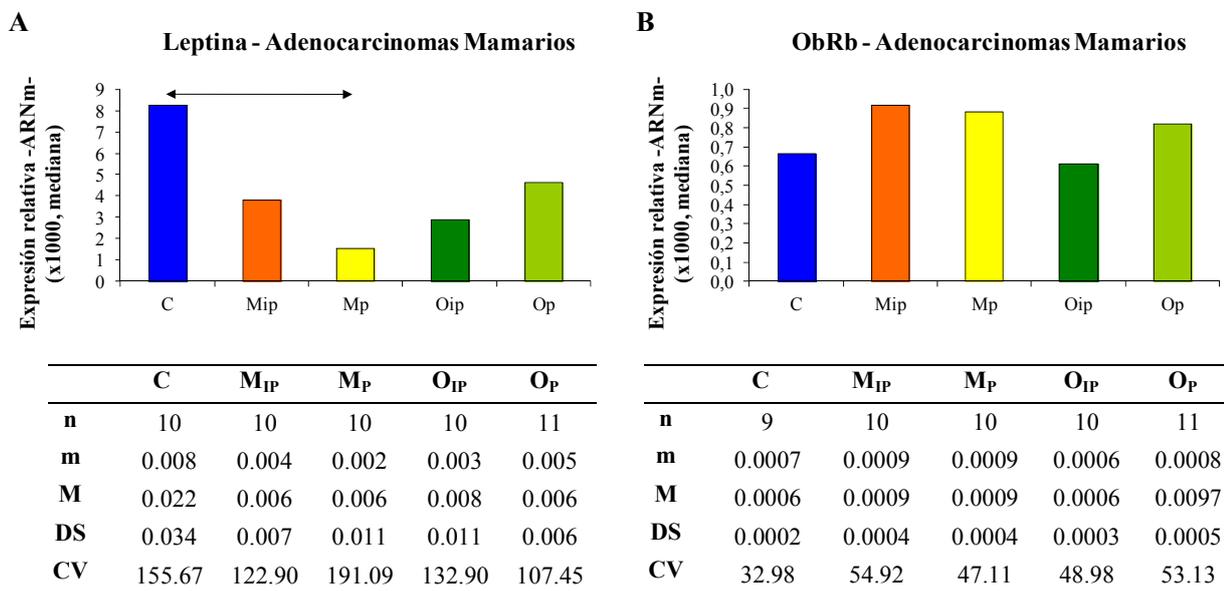
## 5. HORMONAS Y RECEPTORES RELACIONADOS CON LÍPIDOS Y CÁNCER DE MAMA.

Debido a su implicación en la carcinogénesis mamaria, se analizó la expresión de varias hormonas en muestras de adenocarcinomas mamarios obtenidos al final del estudio (246 días de edad).

### 5.1. Leptina y su Receptor.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la hormona Leptina y su receptor (ObRb) fueron analizados en distintos tejidos y los resultados de dichos análisis son presentados en distintos apartados según el contexto funcional. De esta manera, a continuación, en la Figura 64, se muestra el estudio realizado en adenocarcinomas mamarios.

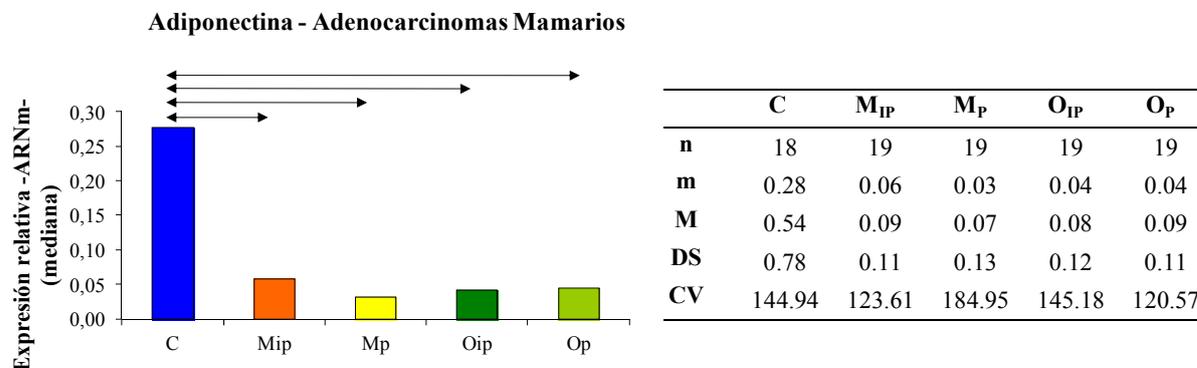
El nivel de expresión de la hormona adipocitaria Leptina fue superior en el grupo control respecto a todos los grupos experimentales, siendo la comparación con el grupo M<sub>P</sub> estadísticamente significativo. En cuanto al receptor de Leptina (ObR), el estudio no mostró diferencias entre grupos.



**Figura 64. Expresión relativa del ARNm de Leptina (A) y su receptor (B) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 5.2. Adiponectina.

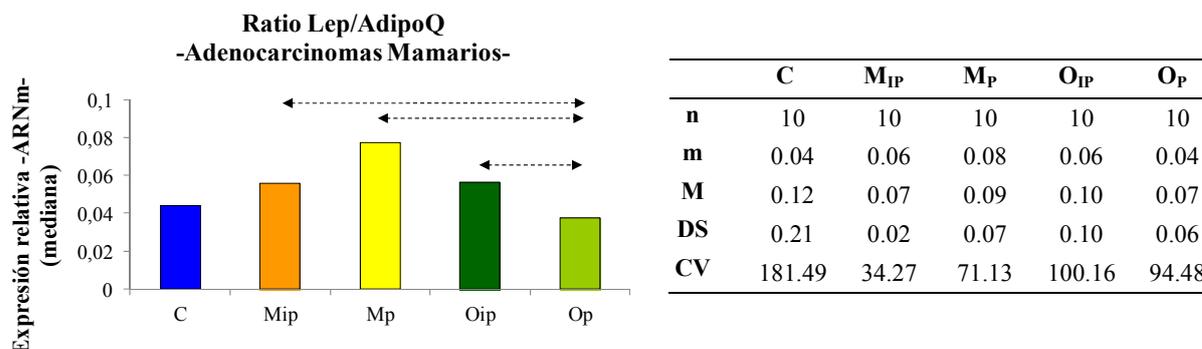
El análisis de la expresión relativa Adiponectina en los adenocarcinomas mamarios mostró una disminución significativa en todos los grupos de dieta hiperlipídica (Figura 65).



**Figura 65.** Expresión relativa del ARNm de Adiponectina en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 5.3. Relación Leptina y Adiponectina.

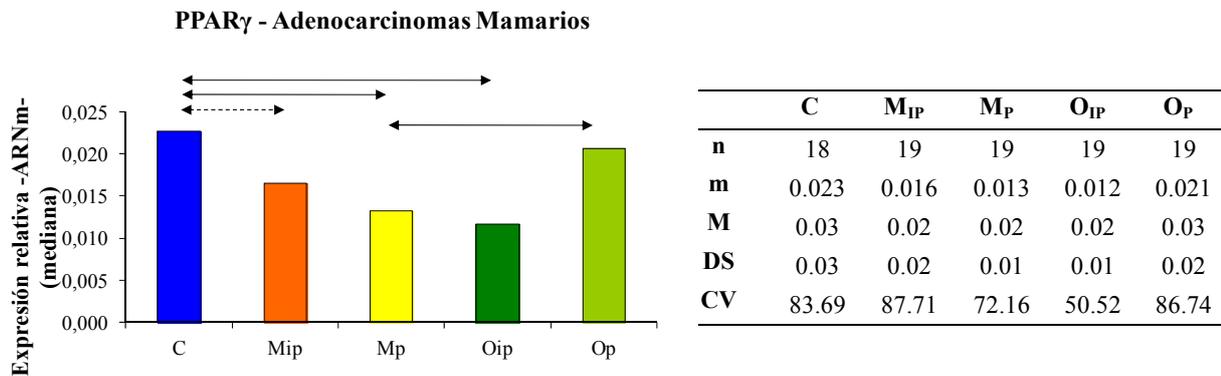
El análisis de la relación entre la expresión del ARNm de Leptina y de Adiponectina reveló una mayor proporción entre ambas adipoquinas en el grupo de dieta hiperlipídica M<sub>P</sub>, mientras que O<sub>P</sub> fue el que presentó menor proporción (Figura 66).



**Figura 66.** Relación entre la expresión relativa del ARNm de Leptina y Adiponectina en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio. Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 5.4. Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ).

El estudio de la expresión del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) mostró una disminución en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica excepto el grupo Op. Asimismo, dicho grupo presentó una mayor expresión que el grupo Mp (Figura 67).



**Figura 67. Expresión relativa del ARNm de PPAR $\gamma$  en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### C. MECANISMOS MOLECULARES DE LA CARCINOGENÉISIS.

#### 1. ESTRÉS OXIDATIVO.

##### 1.1. Enzimas Antioxidantes.

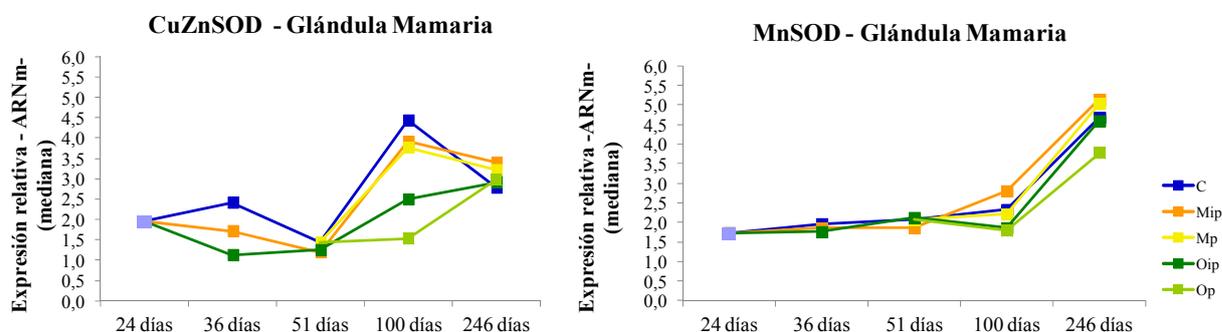
El estudio de la capacidad antioxidante enzimática consistió en el análisis de la expresión y la actividad de las principales enzimas antioxidantes: CuZnSOD, MnSOD, cGPx, PHGPx y CAT. Los análisis se realizaron en glándula y en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales.

##### 1.1.1. Expresión del ARNm en Glándula Mamaria.

En la Figura 68 y en el Anexo Tabla 24 se muestra el análisis de la expresión relativa del ARNm de CuZnSOD y MnSOD por separado (Figura 68A y B, respectivamente).

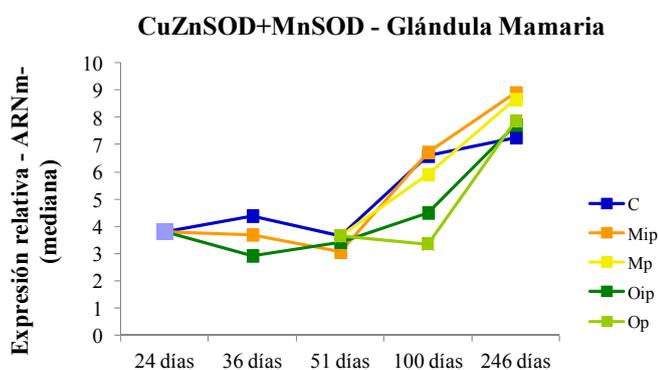
La expresión de ambas isoformas no se modificó de forma importante entre los 24 y los 51 días de edad. Dicha expresión aumentó en la glándula mamaria inducida, a los 100 días

(CuZnSOD) y 246 días (CuZnSOD y MnSOD) de edad. Por otro lado, la comparación entre grupos no mostró diferencias significativas.



**Figura 68.** Expresión relativa del ARNm de CuZnSOD y MnSOD en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

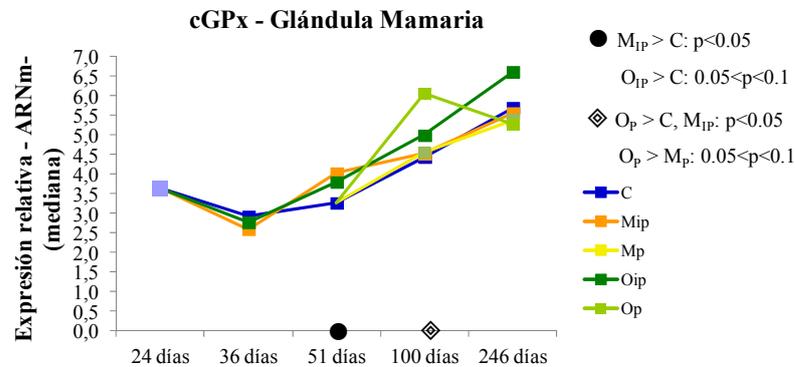
Posteriormente al estudio individual de las isoformas CuZnSOD y MnSOD, se realizó el análisis considerando la expresión total de la enzima SOD como la suma de las expresiones de cada una de las isoformas (CuZnSOD + MnSOD). Los resultados obtenidos fueron muy similares al estudio individual, con un aumento en edades post-inducción y sin diferencias significativas entre grupos experimentales (Figura 69 y Anexo Tabla 24).



**Figura 69.** Expresión relativa del ARNm de SOD total (CuZnSOD+MnSOD) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

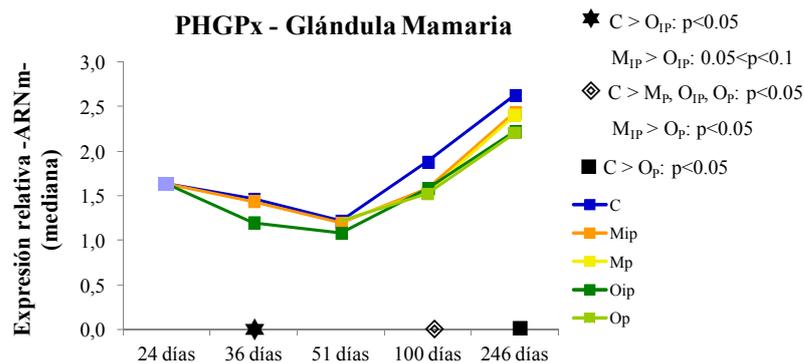
Por otro lado, se analizó la expresión de la enzima antioxidante **GPx** mediante el estudio de las isoformas cGPx y PHGPx. El perfil de expresión de **cGPx** mostró un aumento desde los 36 días hasta el final del ensayo. La comparación entre grupos indicó un aumento de

los niveles en O<sub>IP</sub> y sobretodo en M<sub>IP</sub>, a los 51 días de edad, y un aumento en O<sub>P</sub> a los 100 días (Figura 70 y Anexo Tabla 25).



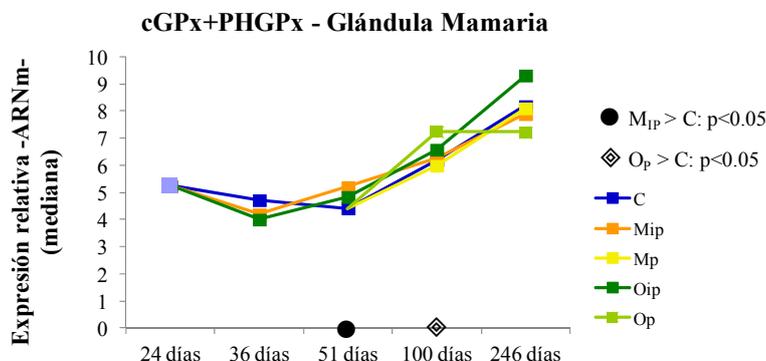
**Figura 70. Expresión relativa del ARNm de cGPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

En cuanto a la isoforma **PHGPx**, los niveles de ARNm disminuyeron de los 24 a los 51 días, para aumentar en edades post-inducción (100 y 246 días). En general, la expresión fue inferior en los grupos de dieta hiperlipídica respecto control (C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>), si bien, únicamente alcanzaron la significación estadística el grupo O<sub>IP</sub> a los 36 días, los grupos M<sub>P</sub> y los alimentados con aceite de oliva a los 100 días y, finalmente, el grupo O<sub>P</sub> a los 246 días de edad (Figura 71 y Anexo Tabla 25).



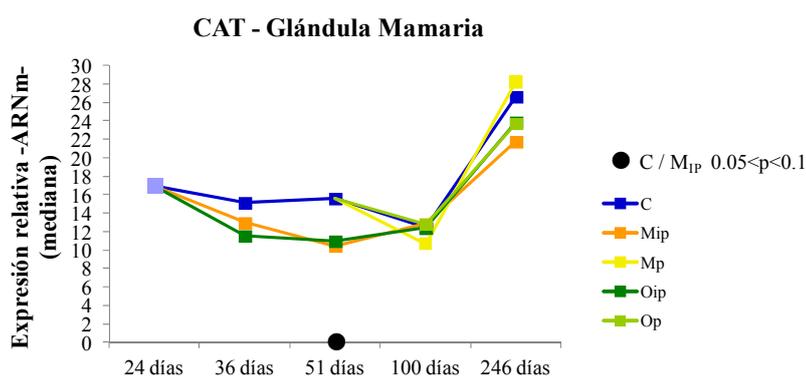
**Figura 71. Expresión relativa del ARNm de PHGPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

En el análisis conjunto de cGPx y PHGPx, se obtuvo un perfil similar al obtenido en cGPx (Figura 72 y Anexo Tabla 25). El grupo control presentó unos valores de expresión significativamente inferiores a M<sub>IP</sub> y a O<sub>p</sub>, a los 51 y 100 días de edad, respectivamente.



**Figura 72.** Expresión relativa del ARNm de GPx total (cGPx+PHGPx) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

Finalmente, se estudió la expresión relativa del ARNm de CAT. La expresión de esta enzima presentó valores similares entre los 24 y los 100 días de edad, aumentando al final del ensayo. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre grupos, únicamente el M<sub>IP</sub> presentó una menor expresión respecto el grupo control, de forma cercana a la significación, a los 51 días de edad (Figura 73 y Anexo Tabla 26).



**Figura 73.** Expresión relativa del ARNm de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

Perfil de expresión de enzimas antioxidantes en glándula mamaria.

La expresión de Catalasa fue superior a la del resto de enzimas analizadas, siendo las diferencias significativas en todos los grupos. El análisis de los resultados mostró diferencias significativas entre las distintas enzimas en todos los grupos experimentales en todas las edades, a excepción de las indicadas en la Figura 74.

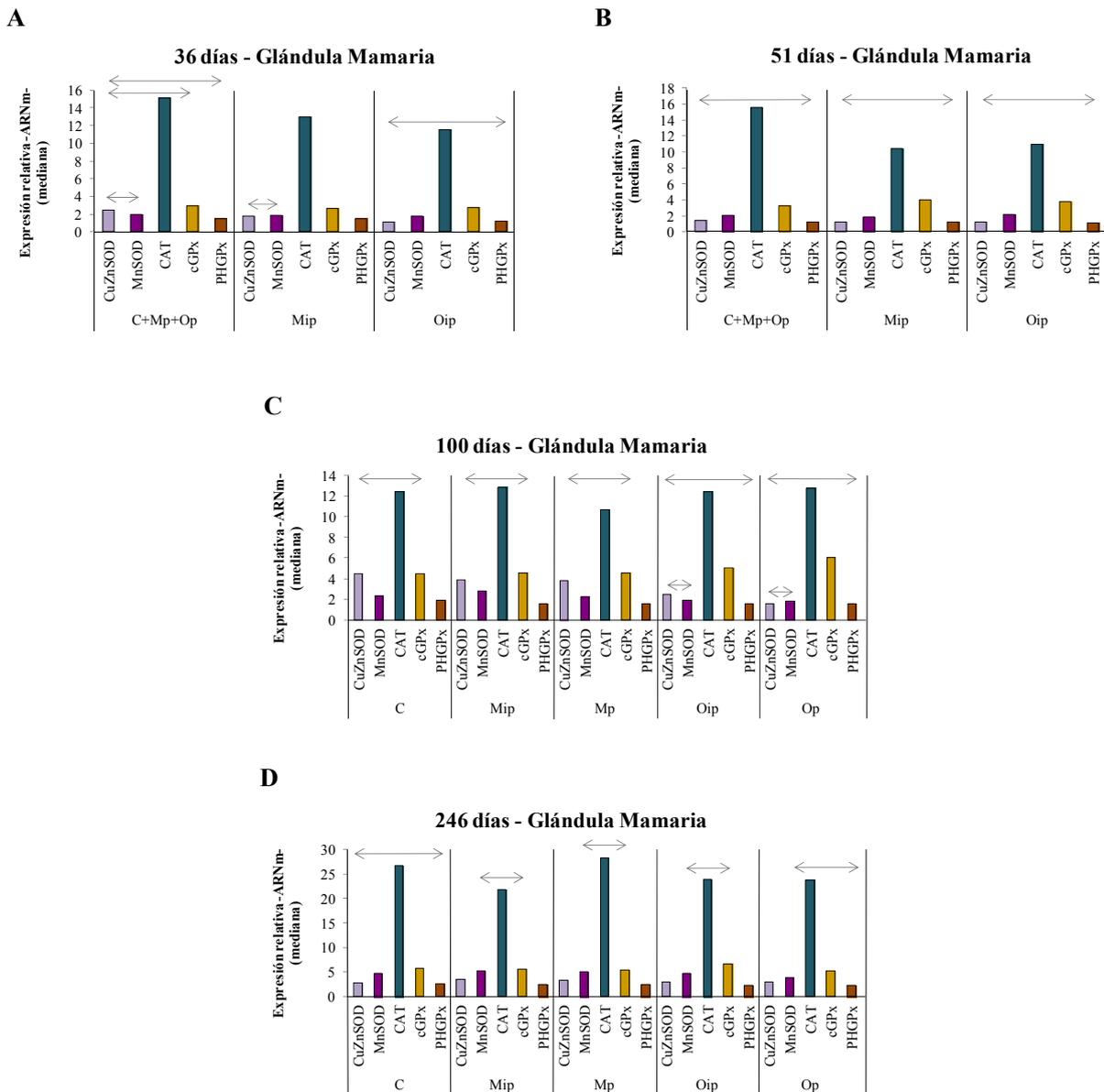


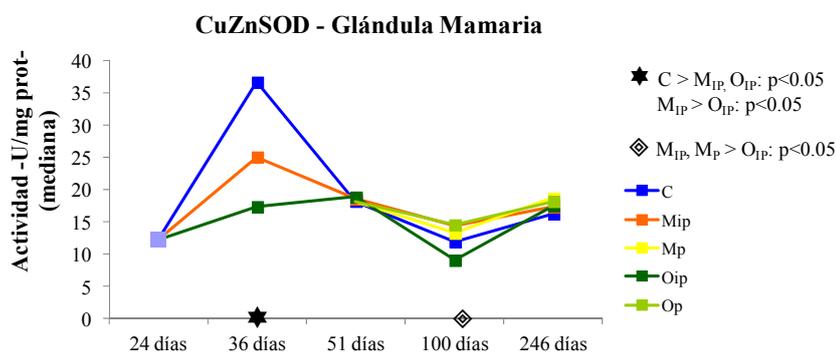
Figura 74. Perfil de expresión relativa del ARNm de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y Catalasa en la glándula mamaria de los grupos experimentales a los 36 días (A), 51 días (B), 100 días (C) y 246 días (D) de edad. TODAS las comparaciones han sido SIGNIFICATIVAS ( $p > 0.05$ ) EXCEPTO las indicadas con una línea GRIS.

A los 36 días no hubo diferencias entre CuZnSOD y MnSOD, cGPx y PHGPx, asimismo MnSOD y PHGPx no mostraron diferencias significativas. A los 51 días ningún grupo presentó diferencias entre las enzimas CuZnSOD y PHGPx, mientras que a los 100 días, los grupos control, M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> no presentaron diferencias entre CuZnSOD y cGPx. En cambio, los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> no mostraron diferencias entre las dos isoformas de SOD ni entre CuZnSOD y PHGPx. Finalmente, a los 246 días de edad, no se observaron diferencias entre cGPC y MnSOD en los grupos M<sub>IP</sub>, M<sub>P</sub> y O<sub>IP</sub>, así como entre PHGPx y CuZnSOD en el grupo control y MnSOD en O<sub>P</sub>.

### 1.1.2. Actividad de la Proteína en Glándula Mamaria.

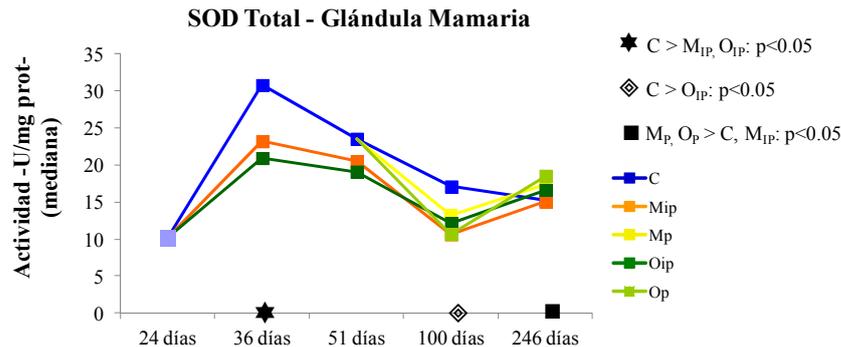
Para el estudio de la actividad SOD se determinaron los niveles de actividad de la isoforma **CuZnSOD** y de **SOD total**. La actividad MnSOD no pudo calcularse a partir de los valores de las actividades SOD total y CuZnSOD por cuestiones metodológicas (véase Material y Métodos, subapartado C.6).

Los resultados del análisis de la actividad CuZnSOD en glándula mamaria se encuentran detallados en la Figura 75 y en el Anexo Tabla 27. A los 36 días se observó una actividad significativamente mayor en el grupo control, seguido del grupo M<sub>IP</sub>. En cambio en las siguientes edades hubo pocas diferencias entre grupos, únicamente a los 100 días de edad, los alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz presentaron de forma significativa, unos niveles de actividad superiores a O<sub>IP</sub>.



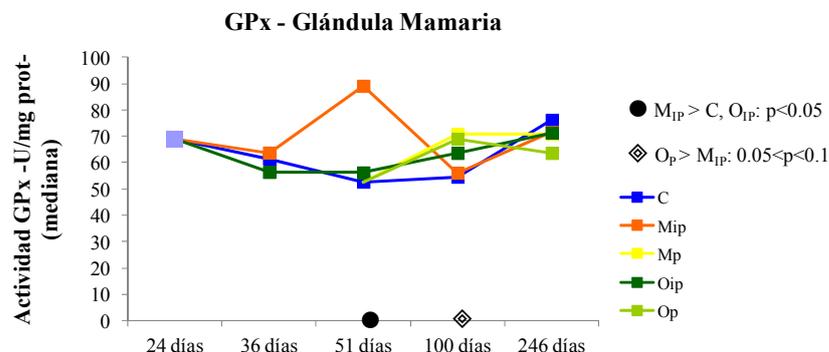
**Figura 75. Niveles de actividad de CuZnSOD en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

La actividad **SOD total** aumentó en todos los grupos de los 24 a los 36 días, para disminuir progresivamente hasta los 100-246 días. Hasta los 100 días todos los grupos de dieta hiperlipídica presentaron una actividad SOD inferior a la del grupo control, siendo estas diferencias significativas respecto a O<sub>IP</sub> a los 36 y a los 100 días de edad (Figura 76 y Anexo Tabla 27). Al final del ensayo la actividad SOD fue superior en M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> respecto al control y al grupo M<sub>IP</sub>, a pesar de que las diferencias fueron cuantitativamente pequeñas.



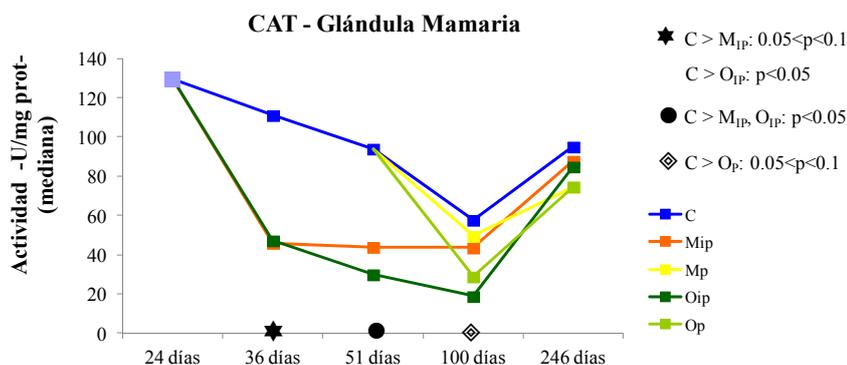
**Figura 76. Niveles de actividad de SOD total en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

En el análisis de los niveles de actividad la **Glutación peroxidasa (GPx) total**, no se encontraron grandes diferencias a lo largo del tiempo ni entre grupos experimentales. Únicamente M<sub>IP</sub>, a los 51 días de edad mostró una actividad mayor a la del resto de grupos. Por otro lado, a los 100 días, el nivel de O<sub>P</sub> fue superior que M<sub>IP</sub>, aunque cercano a la significación (Figura 77 y Anexo Tabla 28).



**Figura 77. Niveles de actividad de GPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

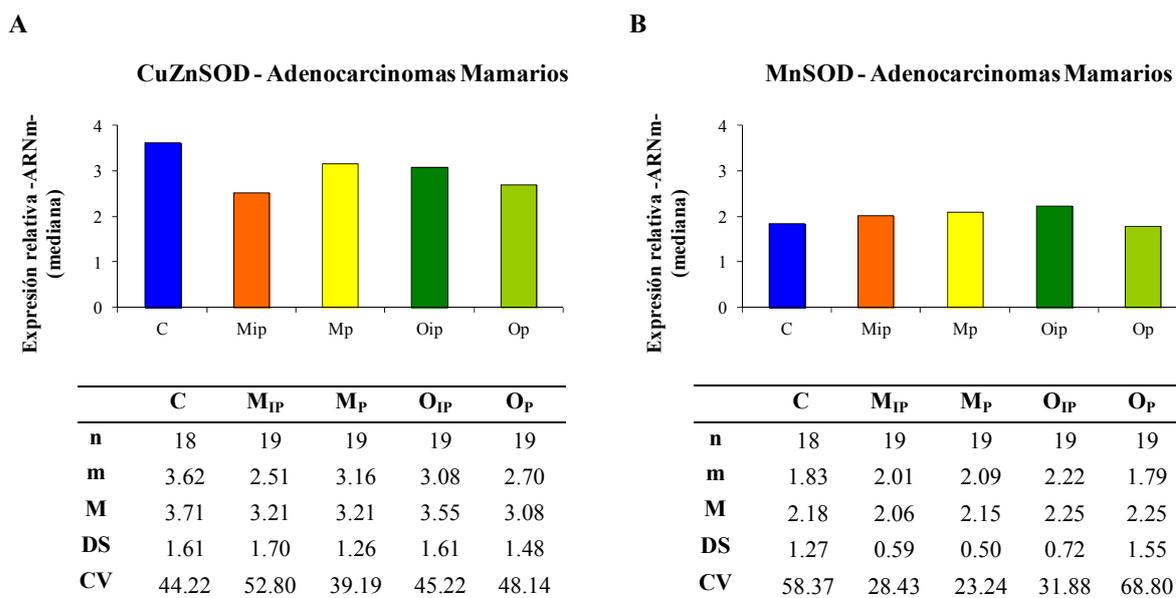
En cuanto a la enzima **Catalasa**, su actividad disminuyó en todos los grupos experimentales desde los 24 hasta los 100 días de edad, para aumentar a los 246 días. Los niveles de actividad de todos los grupos de dieta hiperlipídica fueron inferiores a los del control (C+M<sub>P</sub>+O<sub>P</sub>), de forma muy marcada a los 36 y 51 días de edad. A los 100 días, únicamente fue cercano a la significación la diferencia entre el grupo control y O<sub>P</sub> (Figura 78 y Anexo Tabla 29).



**Figura 78. Niveles de actividad Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

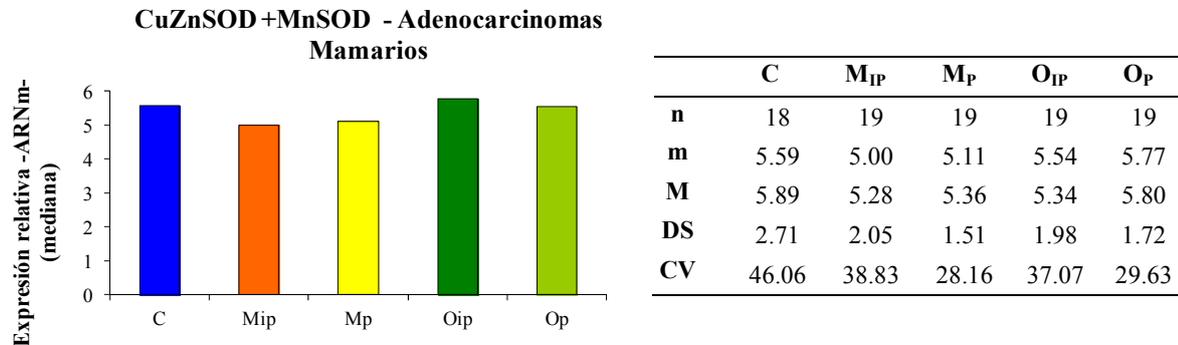
### 1.1.3. Expresión del ARNm en Adenocarcinomas Mamarios.

Los resultados del análisis de **CuZnSOD** y **MnSOD** se muestran en la Figura 79. No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales en el estudio de ambas enzimas.



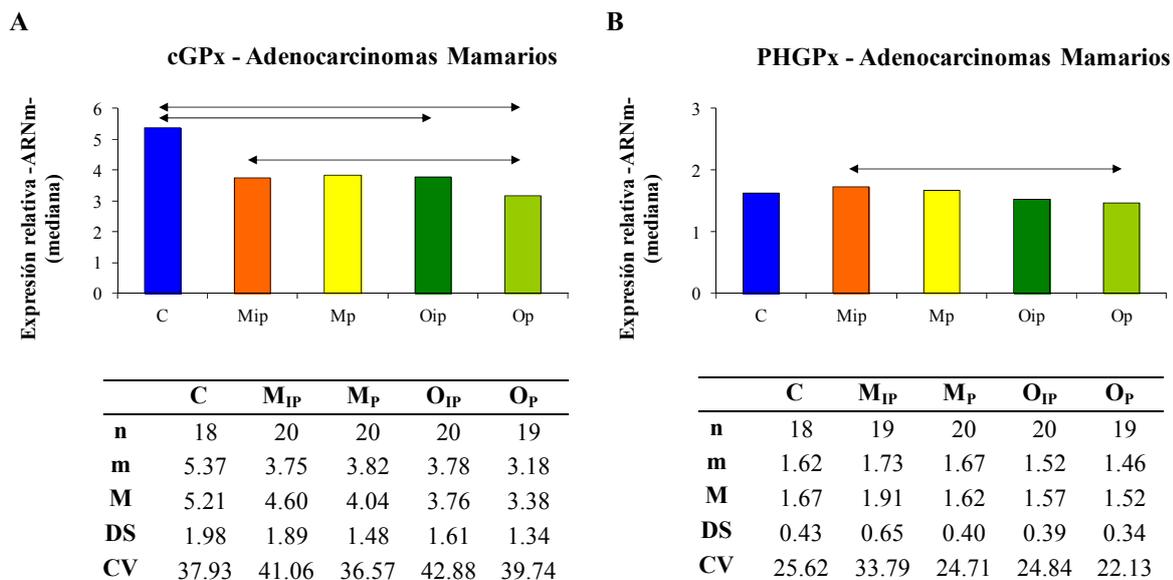
**Figura 79. Expresión relativa del ARNm de CuZnSOD (A) y MnSOD (B) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ): n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

El análisis de la expresión relativa de **SOD total**, como la suma de las expresiones de cada una de las isoformas estudiadas (CuZnSOD + MnSOD), no mostró diferencias entre los grupos experimentales (Figura 80).



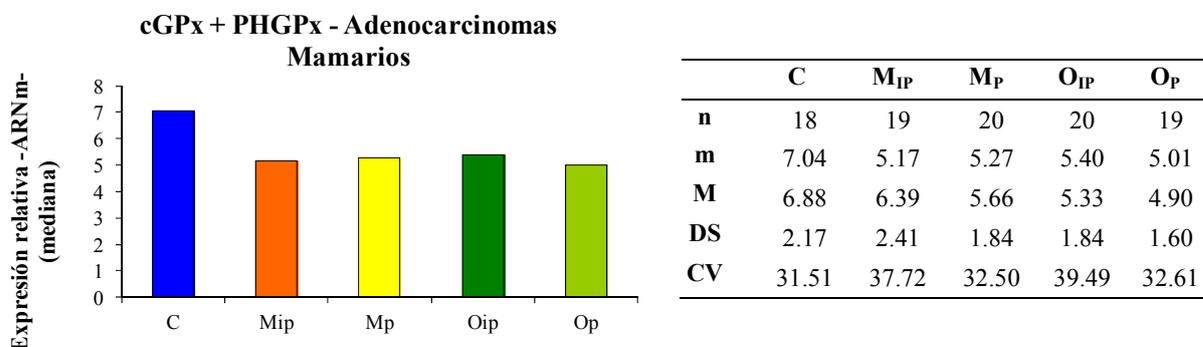
**Figura 80. Expresión relativa del ARNm de SOD total (CuZnSOD + MnSOD) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ): n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

En cuanto al estudio **cGPx**, los resultados mostraron una disminución de los niveles de ARNm en todos los grupos alimentados con dieta hiperlipídica, especialmente O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>. La disminución de O<sub>P</sub> también resultó significativa en comparación con los valores de M<sub>IP</sub> (Figura 81A). Por otro lado, los niveles de expresión relativa del ARNm de **PHGPx** fueron muy similares en los diferentes grupos experimentales, encontrándose únicamente una disminución en O<sub>P</sub> respecto M<sub>IP</sub> (Figura 81B).



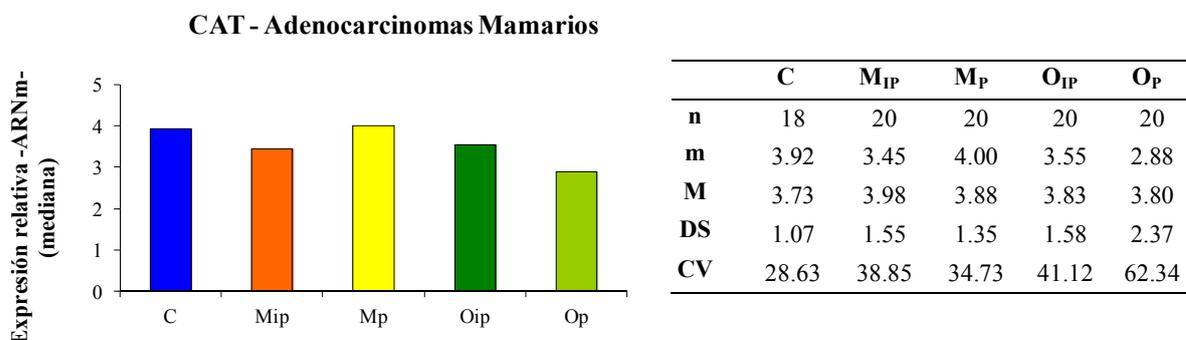
**Figura 81. Expresión relativa del ARNm de cGPx (A) y PHGPx (B) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

El análisis de la expresión de **GPx total** (cGPx + PHGPx) dio como resultado un perfil similar al obtenido en el estudio de la isoforma cGPx, aunque los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 82).



**Figura 82. Expresión relativa del ARNm de GPx total (cGPx + PHGPx) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

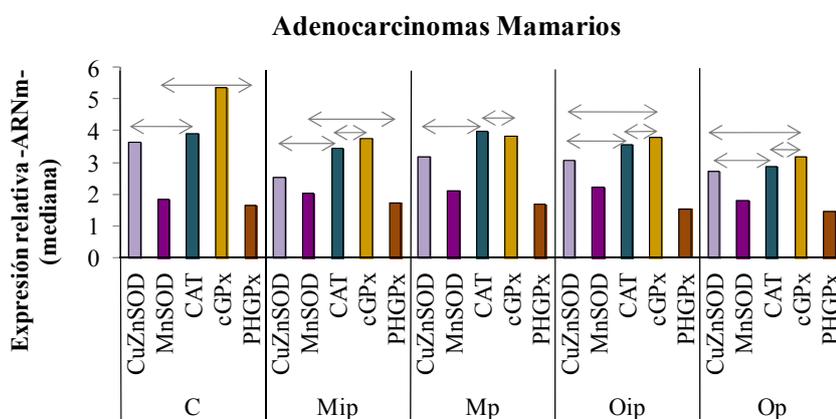
En relación al análisis de la expresión relativa del ARNm de **Catalasa** no se encontraron diferencias significativas entre grupos tal y como se muestra en la Figura 83.



**Figura 83. Expresión relativa del ARNm de CAT en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Perfil de expresión de enzimas antioxidantes en adenocarcinomas mamarios.

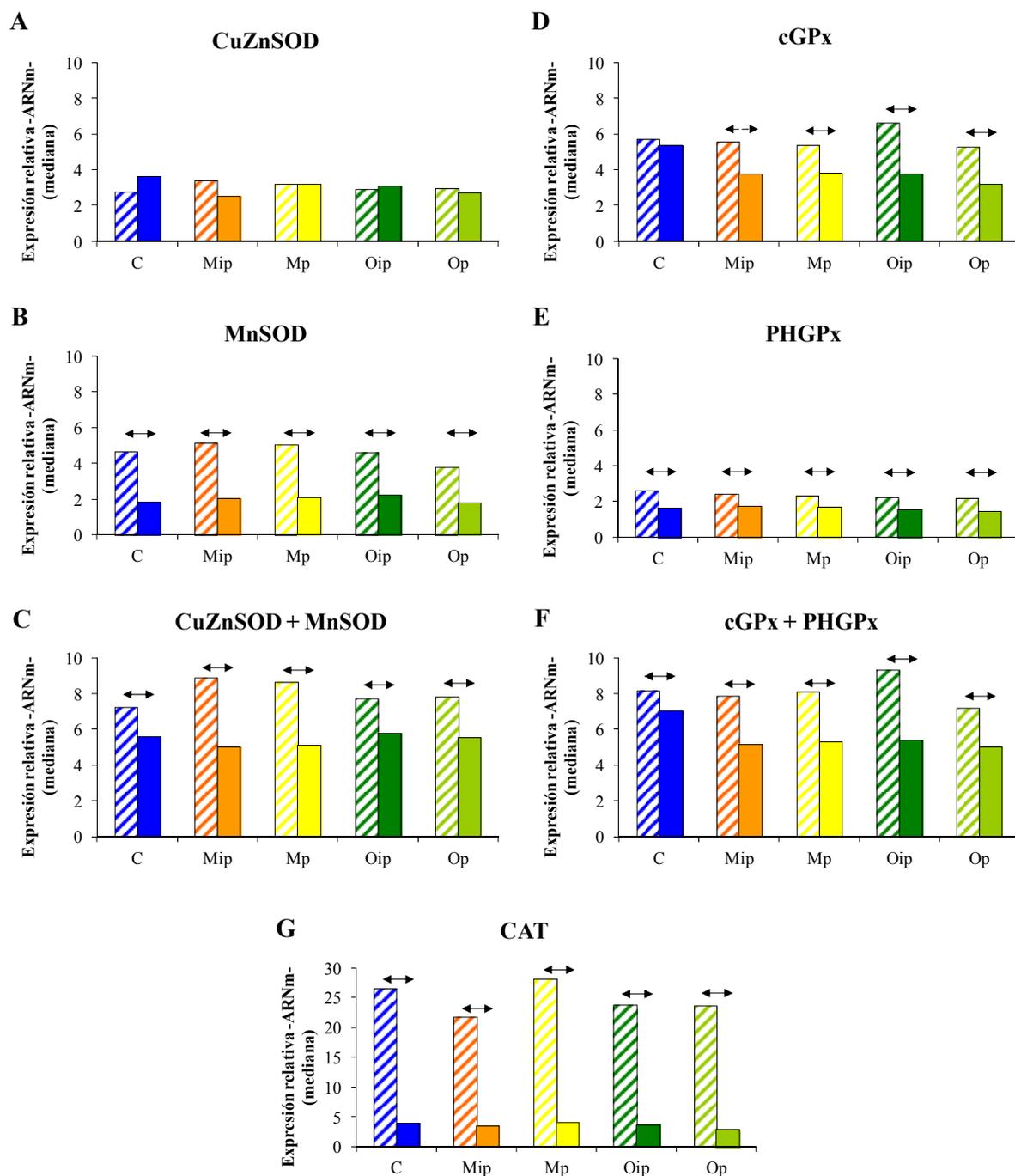
Los diferentes grupos experimentales presentaron patrones de expresión de las enzimas antioxidantes muy similares (Figura 84). En el grupo control se observó que los mayores niveles de expresión, de forma significativa, correspondían a la isoforma cGPx, seguida de catalasa y CuZnSOD. Las enzimas MnSOD y PHGPx mostraron los niveles significativamente más bajos. Sin embargo, tal como se ha descrito en los apartados anteriores, los grupos de dieta hiperlipídica presentaron niveles de expresión de cGPx inferiores a los del grupo control y más similares a Catalasa.



**Figura 84. Perfil de expresión relativa del ARNm de las enzimas antioxidantes SOD, Catalasa y GPx en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio. TODAS las comparaciones han sido SIGNIFICATIVAS ( $p < 0.05$ ) EXCEPTO las indicadas con una línea GRIS.**

Comparación de la expresión de enzimas antioxidantes entre adenocarcinomas y glándula mamaria.

Los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes analizadas al final del estudio, fueron significativamente inferiores en los tumores mamarios respecto a la glándula mamaria. Estos resultados se mantienen para todos los grupos experimentales a excepción de la enzima CuZnSOD, en la que el análisis no mostró diferencias significativas, así como en el caso del grupo control de la enzima cGPx (Figura 85).

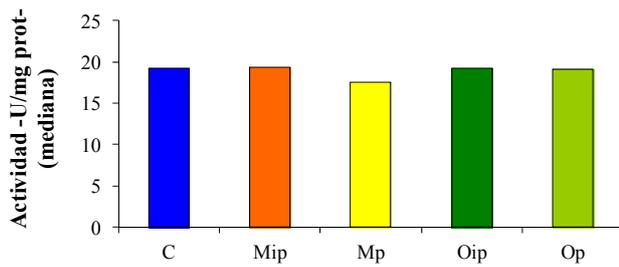


**Figura 85. Expresión relativa del ARNm de las enzimas antioxidantes en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio.** A: CuZnSOD; B: MnSOD; C: SOD total; D: cGPx; E: PHGPx; F: GPx total; G: CAT. Trama rayada: glándula mamaria; trama rellena: adenocarcinoma mamario. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

#### 1.1.4. Actividad de la Proteína en Adenocarcinomas Mamaros.

La actividad de la isoforma **CuZnSOD** fue muy similar en todos los grupos experimentales (Figura 86).

**CuZnSOD - Adenocarcinomas Mamarios**

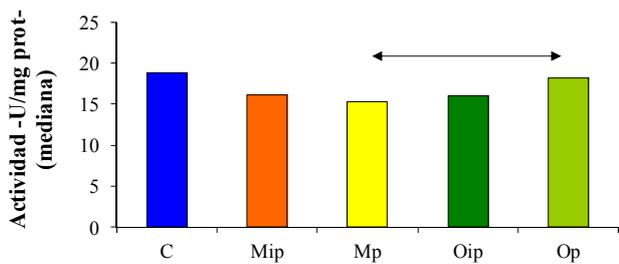


	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>n</b>	10	19	20	19	20
<b>m</b>	19.16	19.30	17.49	19.26	19.13
<b>M</b>	19.70	17.97	17.68	19.76	19.35
<b>DS</b>	6.12	4.65	4.06	4.79	4.79
<b>CV</b>	31.07	25.86	22.95	24.26	24.75

**Figura 86. Niveles de actividad CuZnSOD en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Los resultados del análisis de la actividad **SOD total** no mostraron diferencias respecto al grupo control, únicamente la actividad de M<sub>P</sub> fue significativamente inferior a la de O<sub>P</sub> (Figura 87).

**SOD Total - Adenocarcinomas Mamarios**

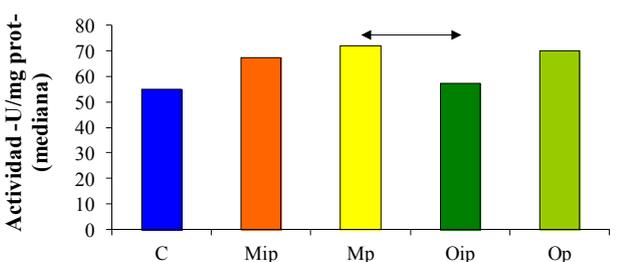


	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>n</b>	10	19	20	19	20
<b>m</b>	18.78	16.14	15.22	15.95	18.21
<b>M</b>	18.37	16.57	15.85	16.96	18.02
<b>DS</b>	5.60	4.19	5.49	4.83	3.93
<b>CV</b>	30.47	25.30	34.67	28.49	21.81

**Figura 87. Niveles de actividad SOD total en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

El análisis de actividad **GPx** no mostró diferencias significativas entre los grupos de dieta hiperlipídica respecto al control. La comparación entre grupos reveló un aumento de M<sub>P</sub> respecto O<sub>IP</sub> (Figura 88).

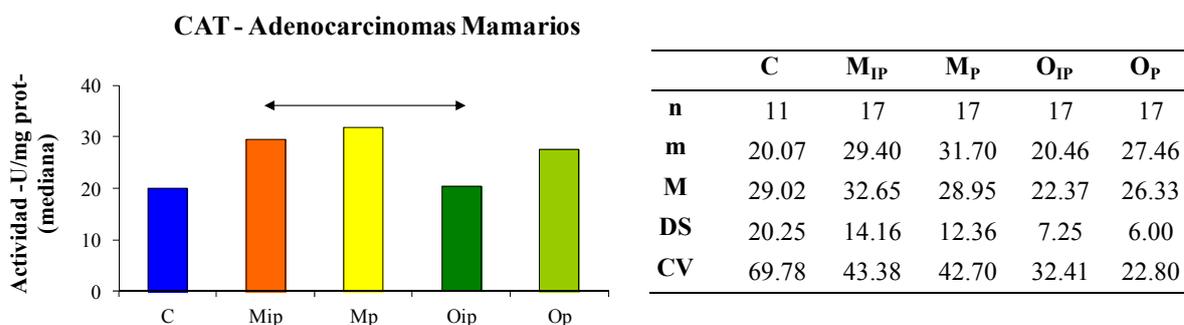
**GPx - Adenocarcinomas Mamarios**



	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>n</b>	11	17	17	16	16
<b>m</b>	55.09	67.12	72.13	57.08	69.87
<b>M</b>	63.75	69.15	75.57	58.69	69.72
<b>DS</b>	22.42	14.77	17.71	19.53	20.55
<b>CV</b>	35.18	21.36	23.43	33.27	29.47

**Figura 88. Niveles de actividad GPx en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

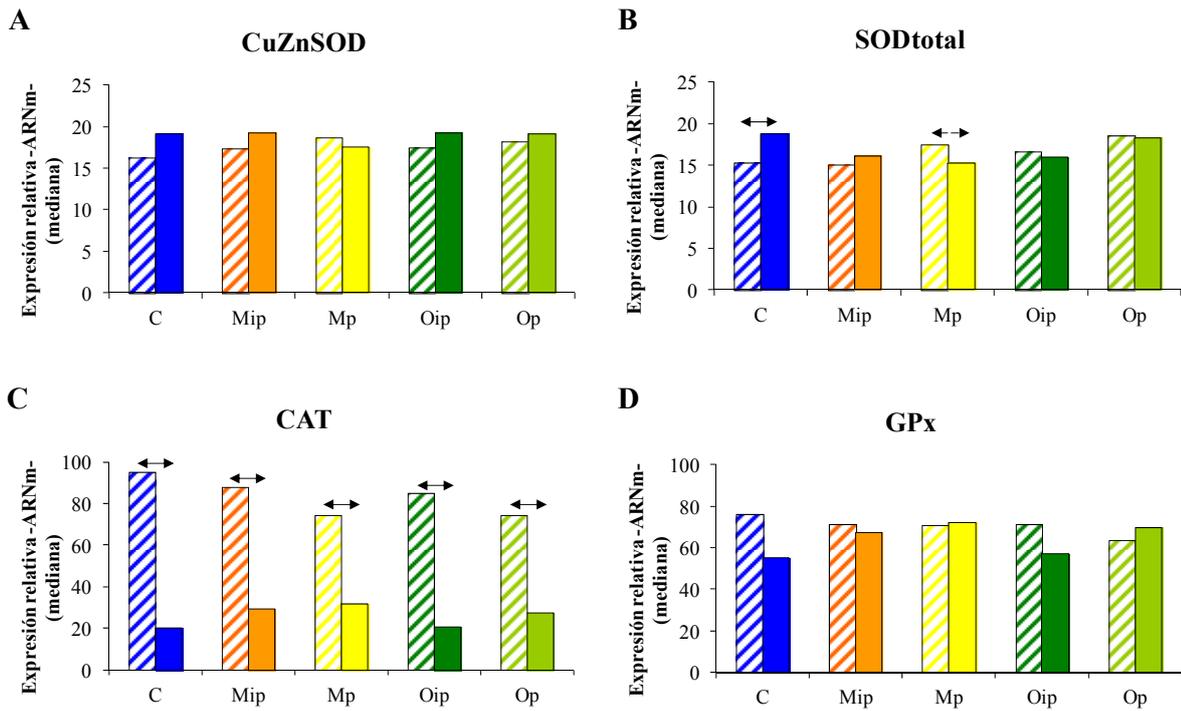
El estudio de la actividad **CAT** mostró un aumento de los niveles de actividad en los grupos M<sub>IP</sub>, M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub>, respecto al control, a pesar de que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, mientras que los niveles del grupo O<sub>IP</sub> fueron similares. Entre los grupos de dieta hiperlipídica, la comparación entre M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> fue estadísticamente significativa (Figura 89). Cabe destacar que el perfil de actividad catalasa y el de GPx fueron similares.



**Figura 89. Niveles de actividad Catalasa en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

#### Comparación de la actividad enzimática entre adenocarcinomas y glándula mamaria.

El estudio comparativo de la actividad de las enzimas antioxidantes al final del estudio, reveló una disminución de forma significativa en los adenocarcinomas mamarios respecto a la glándula mamaria únicamente en el caso de catalasa. Por otro lado, en el caso de la enzima SOD total, mostró una actividad significativamente mayor en los adenocarcinomas del grupo control (Figura 90).

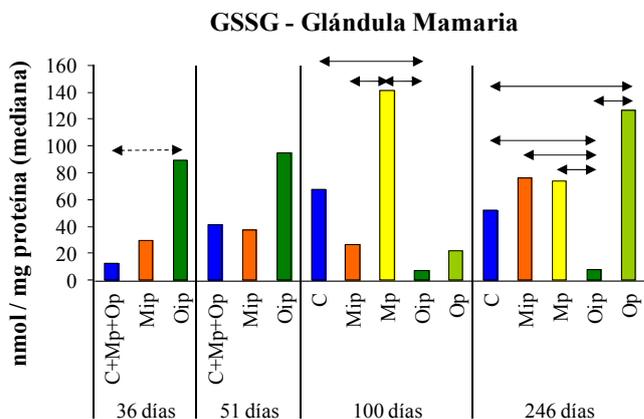


**Figura 90. Niveles de actividad de las enzimas antioxidantes en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio.** A: CuZnSOD; B: SOD total; C: CAT; D: GPx. Trama rayada: glándula mamaria; trama rellena: adenocarcinoma mamario. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05<p<0.1$ ).

## 1.2. Capacidad Antioxidante No Enzimática.

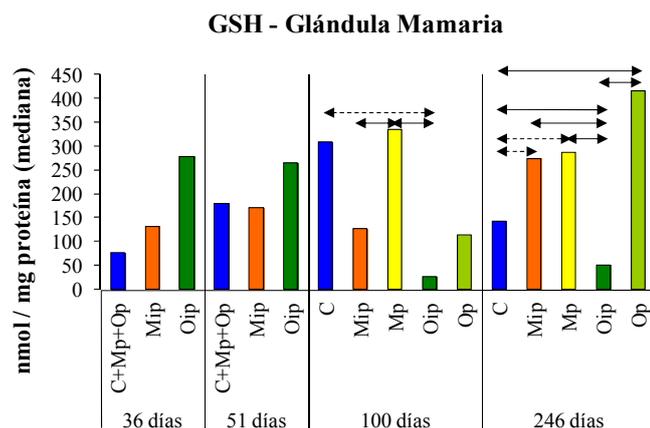
### 1.2.1. Niveles de GSSG y GSH en Glándula Mamaria.

Tal y como se observa en la Figura 91 y en el Anexo Tabla 30, los niveles de GSSG fueron muy heterogéneos a lo largo del tiempo y en todos los grupos experimentales. A los 36 y 51 días O<sub>IP</sub> presentó los mayores niveles de dicha molécula, mientras que en la glándula inducida a 100 y 246 días, fue el grupo que presentó los niveles más bajos. A dichas edades post-inducción, fueron los grupos M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub>, respectivamente, los que destacaron por sus elevados niveles.



**Figura 91. Niveles de GSSG en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05<p<0.1$ ).

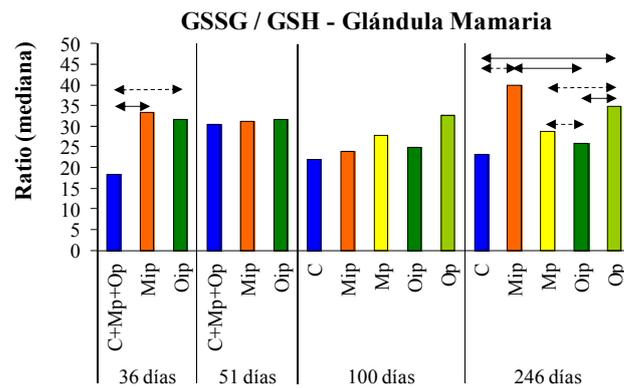
El estudio de la forma reducida del Glutati3n (GSH) mostr3 un perfil parecido al obtenido con GSSG observ3ndose tambi3n algunas diferencias significativas a los 100 y 246 d3as. Los niveles de GSH fueron inferiores en O<sub>IP</sub> en ambas edades. A los 100 d3as, adem3s, M<sub>P</sub> mostr3 niveles significativamente superiores a M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub>, y a los 246 d3as, el grupo control present3 niveles m3s bajos de GSH en comparaci3n a M<sub>IP</sub>, M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> (Figura 92 y Anexo Tabla 30).



**Figura 92. Niveles de GSH en gl3ndula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** Las comparaciones con l3nea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con l3nea discontinua indican diferencias cercanas a la significaci3n ( $0.05 < p < 0.1$ ).

En cuanto a la relaci3n GSSG/GSH, como se muestra en la Figura 93A y B, y en el Anexo Tabla 30, los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> presentaron, a los 36 d3as, una ratio m3s elevada que la del grupo control. A los 51 y 100 d3as los niveles entre grupos fueron muy parecidos, mientras que al final del estudio, M<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> mostraron los valores de la ratio m3s elevados, especialmente en comparaci3n al grupo control y O<sub>IP</sub>.

A



B

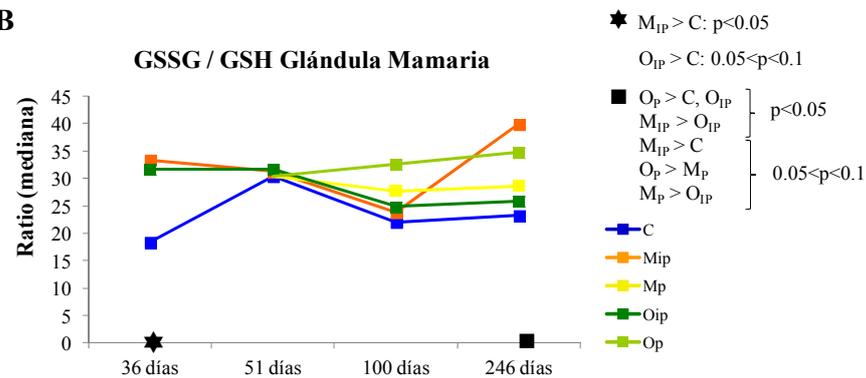
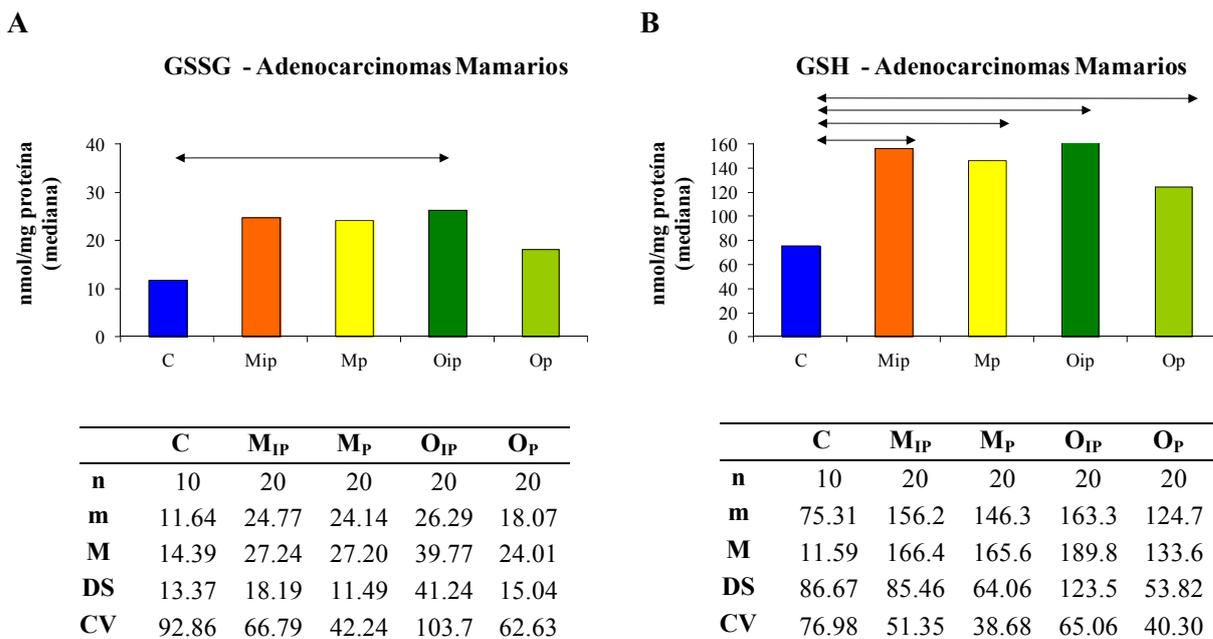


Figura 93. Relación entre los niveles de GSSG y GSH en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades (A y B). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

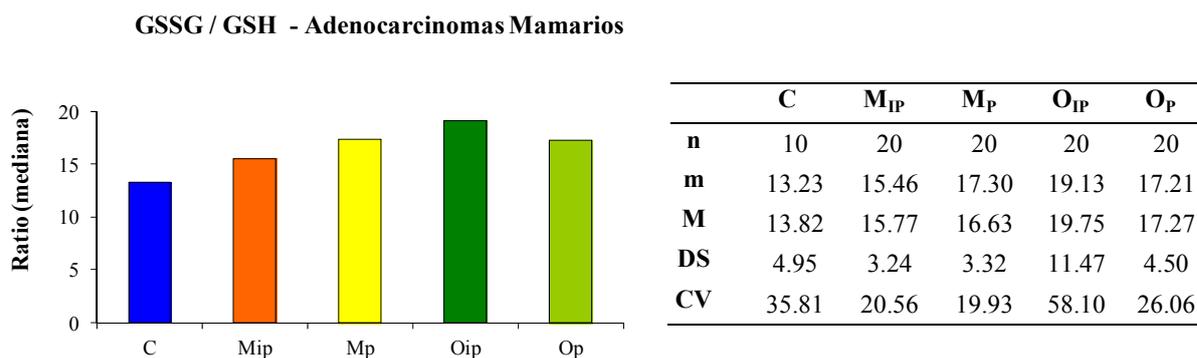
### 1.2.2. Niveles de GSSG y GSH en Adenocarcinomas Mamarios.

En la Figura 94 se muestran los resultados del análisis de los niveles de GSSG y GSH. Los niveles de GSSG aumentaron significativamente por efecto de los lípidos de la dieta, independientemente del tipo, respecto al grupo control (Figura 94A). Por otro lado, todos los grupos de dieta hiperlipídica presentaron niveles de GSH superiores a los del grupo control (Figura 94B). Únicamente las diferencias del grupo  $O_{IP}$  respecto al control fueron significativas, mientras que el aumento de los niveles de GSH en  $M_{IP}$ ,  $M_P$  y  $O_P$  estuvo cercano a la significación ( $0.1 > p > 0.05$ ). Cabe destacar que los niveles de GSSG fueron significativamente inferiores a los de GSH, tanto en glándula como en tumores mamarios.



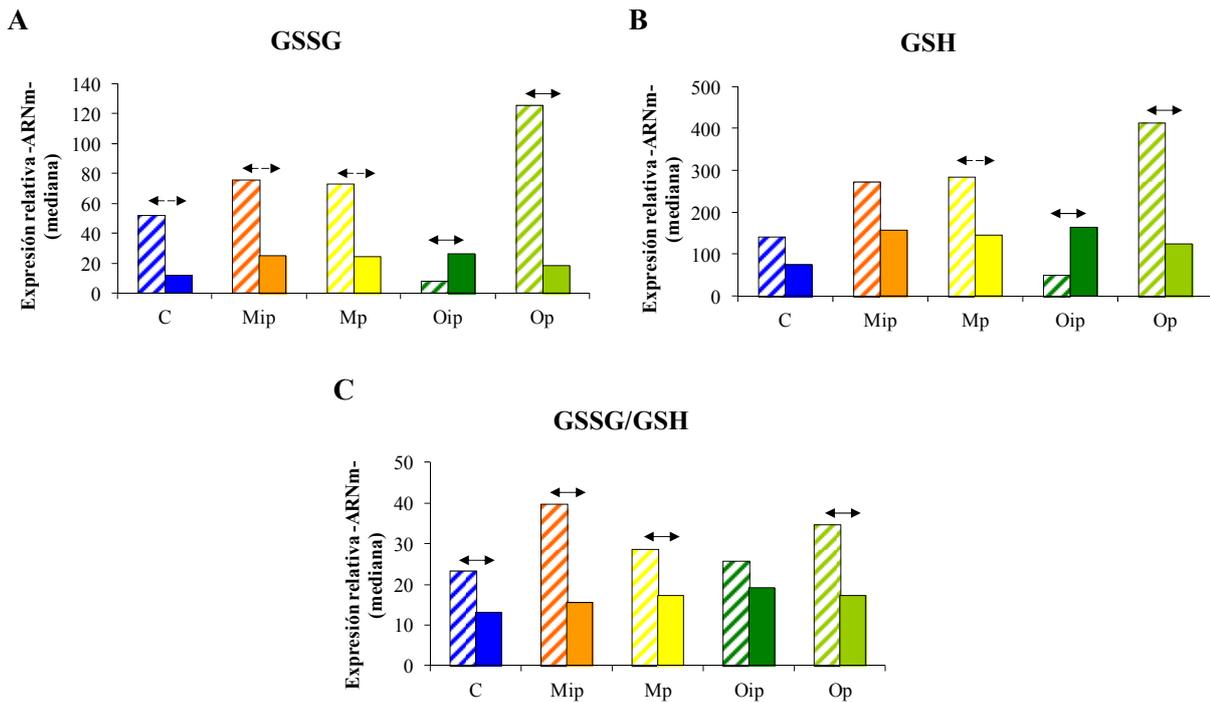
**Figura 94. Niveles de glutatión en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** (A) Niveles de GSSG. (B) Niveles de GSH. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Los valores de la relación GSSG/GSH fueron superiores en todos los grupos de dieta hiperlipídica respecto al control. Las diferencias fueron de pequeña magnitud y únicamente las encontradas entre los grupos de aceite de oliva, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>, respecto al control estuvieron cercanas a la significación estadística ( $0.1 > p > 0.05$ ) (Figura 95).



**Figura 95. Relación entre los niveles de GSSG y GSH en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

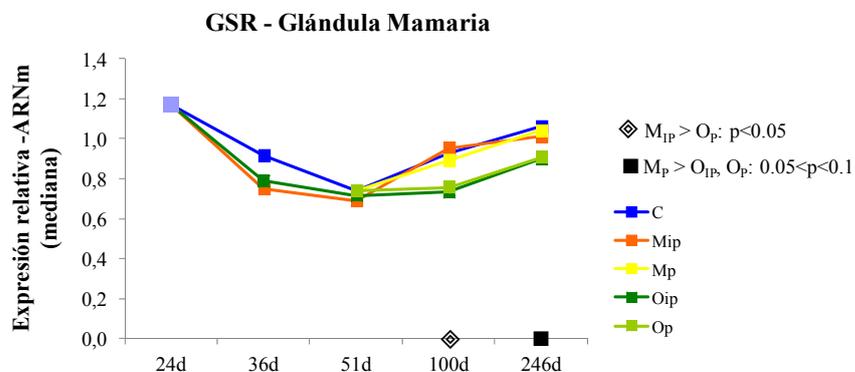
Tanto los niveles de GSH y GSSG como la ratio fueron significativamente superiores en glándula mamaria a los 246 días que en tumor, excepto en el grupo O<sub>IP</sub> donde se observó un aumento de GSH y GSSH en los tumores respecto a la glándula (Figura 96).



**Figura 96. Niveles de glutación en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio.** A: GSSG; B: GSH; C: GSSG/GSH. Trama rayada: glándula mamaria; trama rellena: adenocarcinoma mamario. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ).

### 1.2.3. Niveles de GSR en Glándula Mamaria.

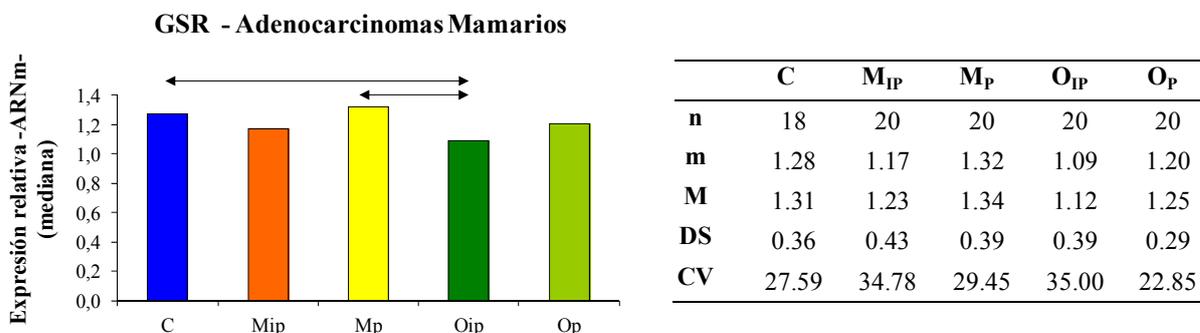
El perfil de expresión relativa de la enzima Glutación reductasa (GSR) en glándula mamaria mostró una disminución de sus niveles en los grupos de dieta hiperlipídica a los 36 días de edad, aunque no de forma significativa. Por otro lado, a los 51 días todos los grupos presentaron niveles similares. En edades posteriores (100 y 246 días) los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de oliva mostraron niveles inferiores al resto de grupos (Figura 97 y Anexo Tabla 31).



**Figura 97. Expresión relativa del ARNm de GSR en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

### 1.2.4. Niveles de GSR en Adenocarcinomas Mamarios.

El estudio de la expresión relativa de GSR en adenocarcinomas mamarios mostró pocas diferencias significativas entre grupos, únicamente se observó una disminución de la expresión en el grupo O<sub>IP</sub> respecto a los grupos control y M<sub>P</sub> (Figura 98).



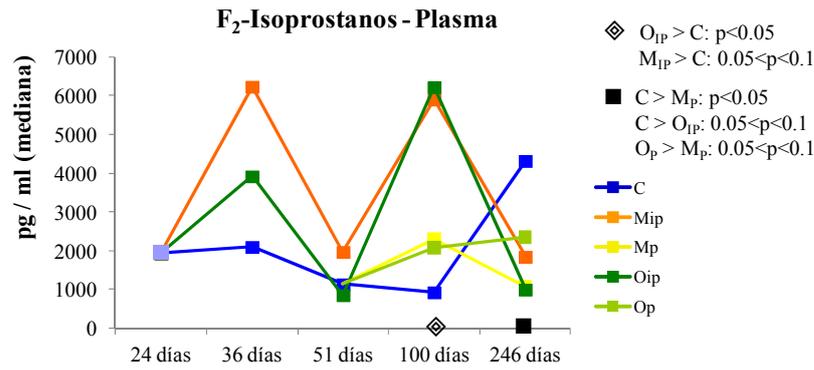
**Figura 98. Expresión relativa del ARNm de GSR en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

### 1.3. Productos de Peroxidación Lipídica.

Con el fin de evaluar el nivel de peroxidación lipídica de los diferentes grupos experimentales se estudiaron los niveles de isoprostanos en plasma y de lipofuscina en hígado. Ambas moléculas son productos finales de la cadena de reacciones que tiene lugar durante la peroxidación de ácidos grasos.

#### 1.3.1. Niveles Plasmáticos de F<sub>2</sub>-IsoP.

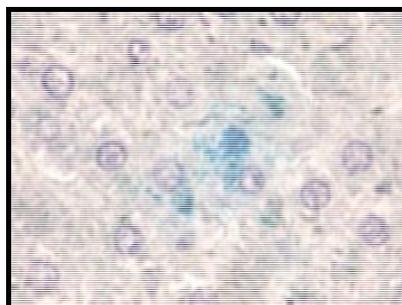
En el estudio de F<sub>2</sub>-IsoP libres en plasma se observó un mayor nivel en los grupos M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> a los 36 y 100 días, de forma significativa a esta última edad en comparación con el grupo control (Figura 99 y Anexo Tabla 32). Por el contrario, al final del estudio se produjo una disminución en todos los grupos de dieta hiperlipídica. Únicamente las diferencias en el grupo M<sub>P</sub> fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control, mientras que en el caso del O<sub>IP</sub> fueron cercanas a la significación. Entre los grupos de dieta hiperlipídica no hubo diferencias, solamente el grupo O<sub>P</sub> presentó niveles superiores cercanos a la significación respecto a M<sub>P</sub>.



**Figura 99. Niveles de F<sub>2</sub>-IsoP libres en plasma de animales de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

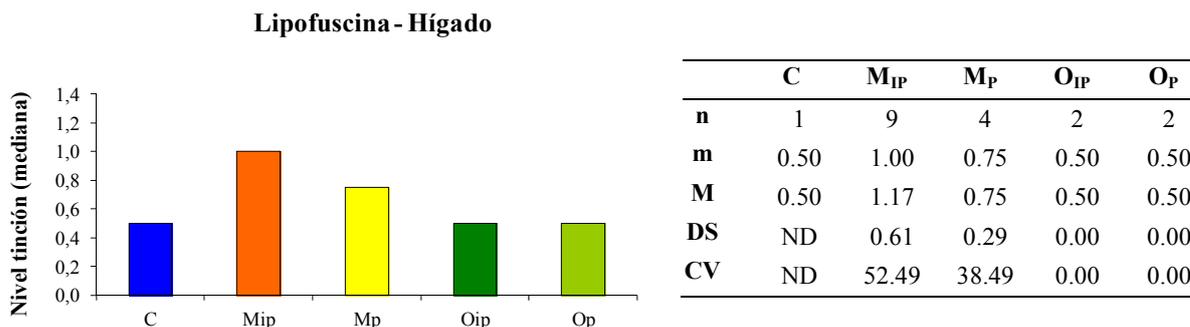
### 1.3.2. Niveles Hepáticos de Lipofuscina.

La lipofuscina fue detectada en cortes histológicos de hígado mediante la tinción de Schmorl. La mayoría de las muestras examinadas no presentaron tinción positiva, excepto en 18 animales repartidos entre los diferentes grupos experimentales al final del estudio, en los cuales se observó una reacción positiva débil o muy débil (Figura 100).



**Figura 100. Imagen representativa de la detección de lipofuscina mediante la tinción de Schmorl en hígado de rata.** Aumento 1000X.

La distribución de las muestras positivas fue la siguiente: 5.6% (1/18) en el grupo control, 47.4% (9/19) en el grupo M<sub>IP</sub>, 21.1% (4/19) en el grupo M<sub>P</sub>, 11.8% (2/17) en el grupo O<sub>IP</sub>, y 10.53% (2/19) en el grupo O<sub>P</sub>. El análisis estadístico cualitativo de estos resultados reveló que las diferencias entre M<sub>IP</sub> y los grupos control, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> fueron significativas. Debido al bajo número de muestras positivas no pudo realizarse un análisis estadístico cuantitativo (Figura 101).

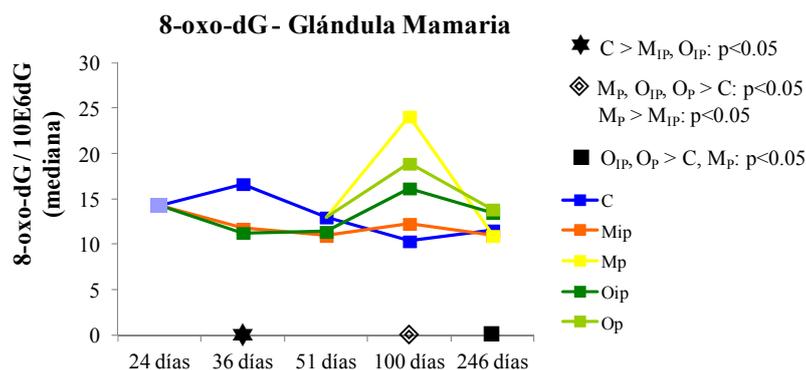


**Figura 101. Niveles de lipofuscina en hígado de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%). ND: No disponible.

## 1.4. Daño Genómico.

### 1.4.1. Niveles de 8-oxo-dG en Glándula Mamaria.

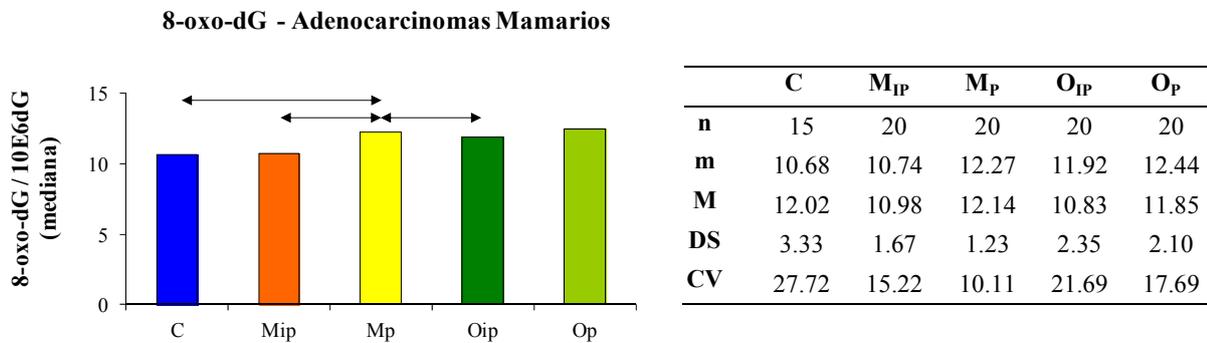
Como puede observarse en la Figura 102 y en el Anexo Tabla 33, los grupos de dieta hiperlipídica mostraron a los 36 días de edad unos niveles de 8-oxo-dG, marcador de daño oxidativo, significativamente inferiores al grupo control, mientras, por el contrario, a 100 días los grupos M<sub>P</sub>, O<sub>IP</sub>, y O<sub>P</sub> presentaron niveles superiores al control. A esa misma edad, los niveles del grupo M<sub>P</sub> fueron también significativamente mayores que los de M<sub>IP</sub>. Al final del estudio, los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> presentaron niveles de 8-oxo-dG, significativamente superiores al control y al grupo M<sub>P</sub>.



**Figura 102. Niveles de 8-oxo-dG en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 10E6dG:  $10^6$  deoxiguanosina. 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

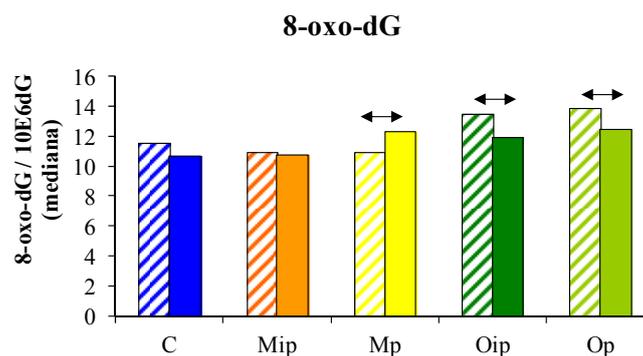
### 1.4.2. Niveles de 8-oxo-dG en Adenocarcinomas Mamarios.

Los niveles de la base modificada 8-oxo-dG aumentaron en el grupo M<sub>P</sub> respecto a los grupos control, M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub> (Figura 103).



**Figura 103. Niveles de 8-oxo-dG en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). 10E6dG:  $10^6$  deoxiguanosina. n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

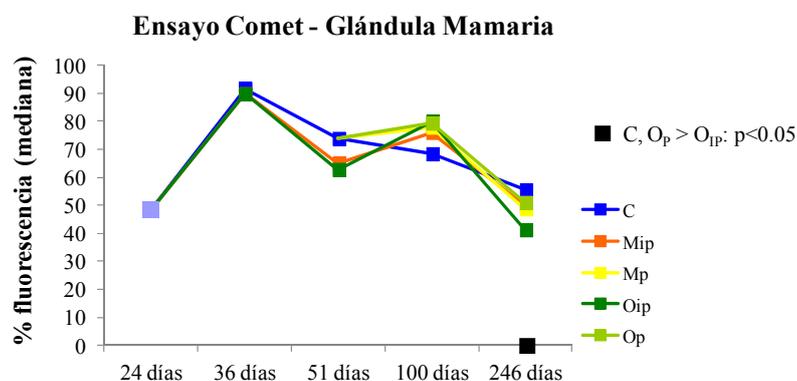
La comparación de los niveles de 8-oxo-dG entre glándula a los 246 días de edad y adenocarcinomas mamarios dio resultados diferentes según el grupo experimental. Así, mientras en el grupo M<sub>IP</sub> no se observaron cambios entre ambos tejidos, igual que en el control, los tumores mamarios del grupo M<sub>P</sub> presentaron un aumento significativo de los niveles de 8-oxo-dG respecto a la glándula mamaria. En cambio, en los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> dichos niveles fueron significativamente inferiores en los tumores (Figura 104).



**Figura 104. Niveles de 8-oxo-dG en adenocarcinomas y glándula mamaria de los grupos experimentales al final del estudio.** A: GSSG; B: GSH; C: GSSG/GSH. Trama rayada: glándula mamaria; trama rellena: adenocarcinoma mamario. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 1.4.3. Ensayo Comet en Glándula Mamaria.

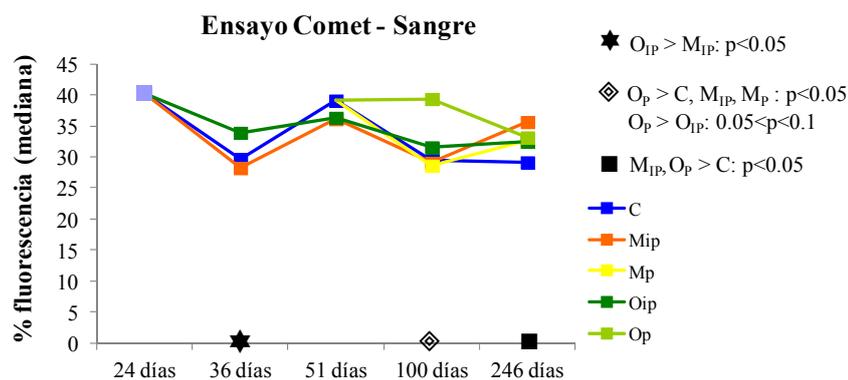
Los resultados obtenidos en el ensayo Comet no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos en las distintas edades experimentales salvo una disminución  $O_{IP}$  respecto al grupo control y  $O_P$  (Figura 105 y Anexo Tabla 34).



**Figura 105. Ensayo Comet en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

### 1.4.4. Ensayo Comet en Sangre.

El análisis de los niveles de daño en el ADN en muestras de sangre mostró un aumento en  $O_{IP}$  respecto  $M_{IP}$  a los 36 días de edad, mientras que a los 100 días  $O_P$  presentó niveles superiores al resto de los grupos. A los 246 días todos los grupos de dieta hiperlipídica mostraron niveles superiores al control, de forma significativa en el caso de  $M_{IP}$  y  $O_P$  (Figura 106 y Anexo Tabla 34).



**Figura 106. Ensayo Comet en muestras de sangre de animales de los grupos experimentales a diferentes edades.** 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental.

Cabe destacar el nivel de daño genómico, detectado en el ensayo comet, en las muestras de glándula mamaria a los 246 días fue superior al de las muestras sanguíneas en todos los grupos experimentales (Figura 107).

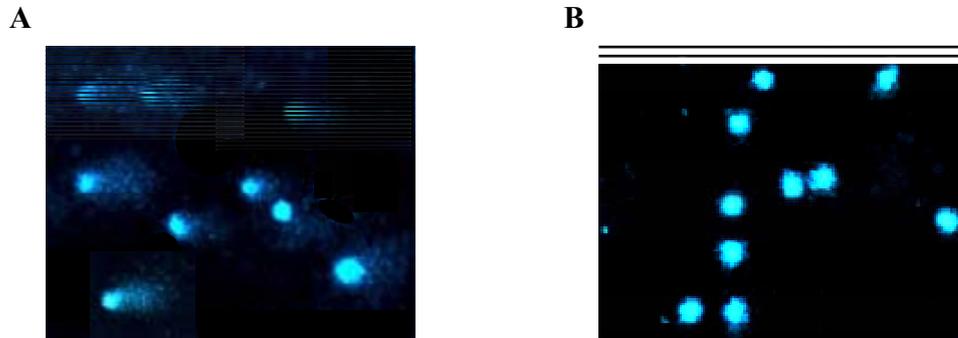


Figura 107. Imágenes representativas del ensayo Comet. (A) Glándula mamaria. (B) Sangre.

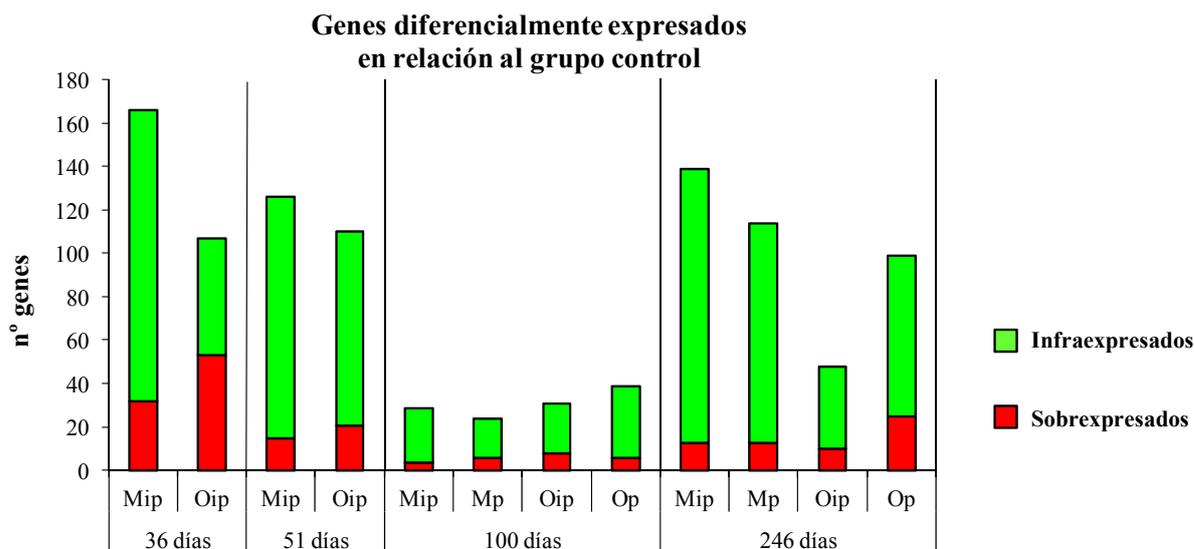
## 2. PERFIL EXPRESIÓN GÉNICA.

En la búsqueda de genes cuya expresión pueda verse modulada por los lípidos de la dieta en glándula mamaria y adenocarcinomas, se utilizó el análisis de *Microarrays* de exones con la plataforma GeneChip® Rat Exon 1.0 ST Array de Affymetrix.

### 2.1. Genes Diferencialmente Expresados por Efecto de los Lípidos de la Dieta.

#### 2.1.1. Glándula Mamaria.

El estudio del perfil de la expresión génica en glándula mamaria de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica, en comparación con el grupo control, mostró, en general, un mayor número de genes infraexpresados (“down-regulated”) que sobrexpresados (“up-regulated”), en todas las edades estudiadas y para todos los grupos experimentales. El número total de genes modulados por efecto de las dietas hiperlipídicas fue superior en el caso de la de aceite de maíz, excepto a los 100 días de edad, donde se hallaron muy pocas diferencias entre los grupos alimentados con dichas dietas y el control (Figura 108).

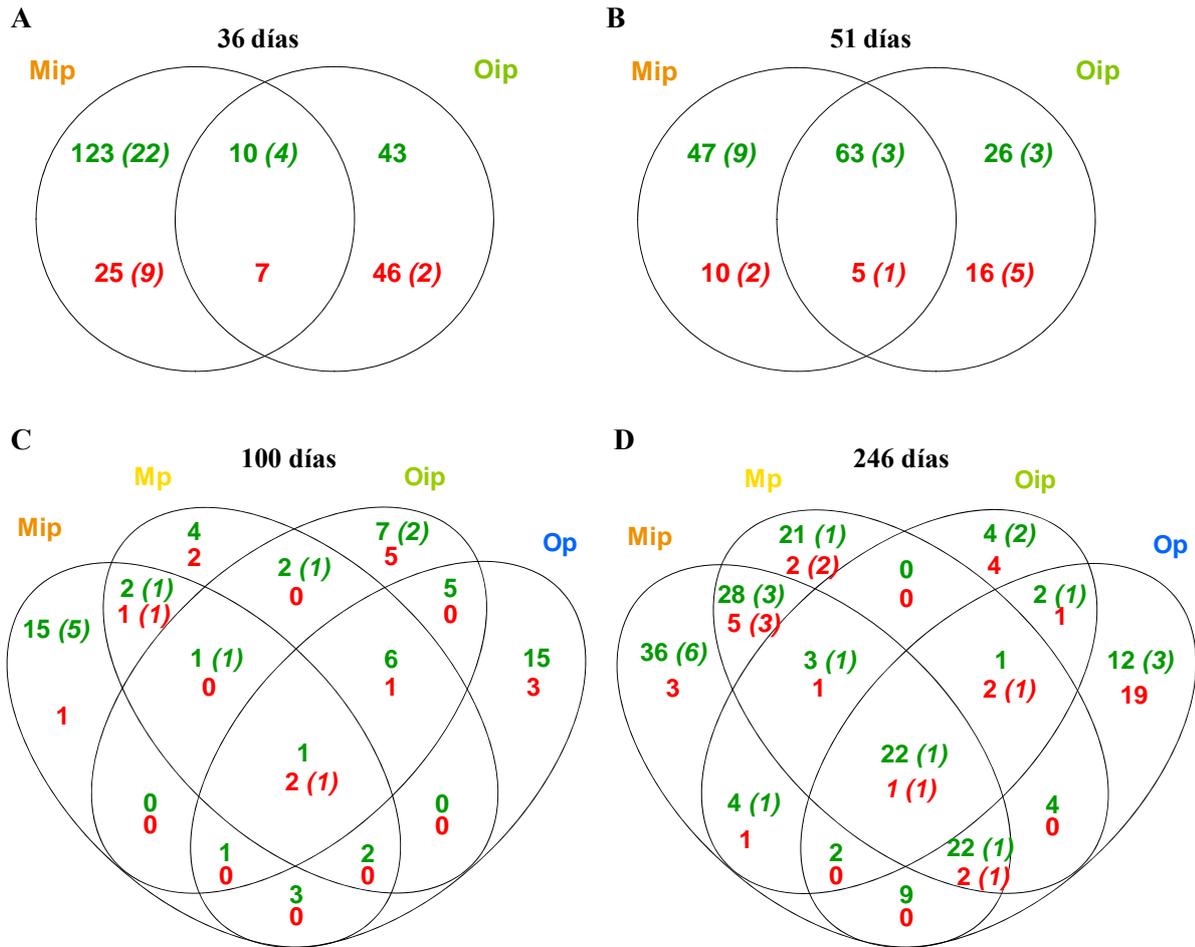


**Figura 108.** Número de genes diferencialmente expresados en glándula mamaria en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica respecto al grupo control a diferentes edades. En verde se indican los genes infraexpresados y en rojo los genes sobreexpresados.

A partir de estos resultados, se determinaron los genes cuya expresión estaba modulada, respecto al grupo control, específicamente en una condición experimental, o los que se encontraron modulados en más de un grupo de dieta hiperlipídica.

A los 36 días de edad, la gran mayoría de genes diferencialmente expresados fueron específicos de cada tipo de dieta, y muy pocos de los genes encontrados fueron modulados por ambas dietas hiperlipídicas (el 5,68% del total de genes hallados a esta edad). Por otro lado, a los 51 días se halló un grupo importante de genes diferencialmente modulados por ambas dietas hiperlipídicas (el 46,32% del total), además de otros genes específicos de cada grupo. Este porcentaje de genes comunes fue significativamente superior al hallado a los 36 días de edad.

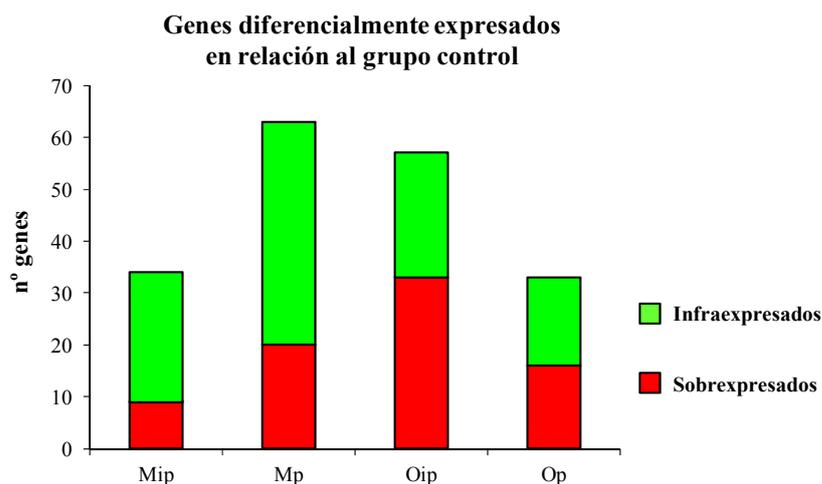
Tal y como se ha comentado, a los 100 días el número de genes hallados fue bajo en todos los casos. A los 246 días el estudio reveló un conjunto de genes modulados en los 4 grupos de dieta hiperlipídica. Asimismo, se halló un número importante de genes modulados por la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, pero no por la del aceite oliva virgen extra; dichos genes fueron tanto específicos de grupo, como comunes a  $M_{IP}$  y  $M_p$ . Por otro lado, el número de genes únicamente modulados por el aceite de oliva fue mucho menor, aunque el grupo  $O_p$  presentó un elevado número de genes sobreexpresados (Figura 109).



**Figura 109. Diagramas de Venn de genes específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica en glándula mamaria a diferentes edades.** Las intersecciones indican los genes compartidos en 2, 3 o los 4 grupos de dieta hiperlipídica. En verde se indica el número de genes conocidos infraexpresados y en rojo los sobreexpresados. Entre paréntesis se indican el número de secuencias no identificadas.

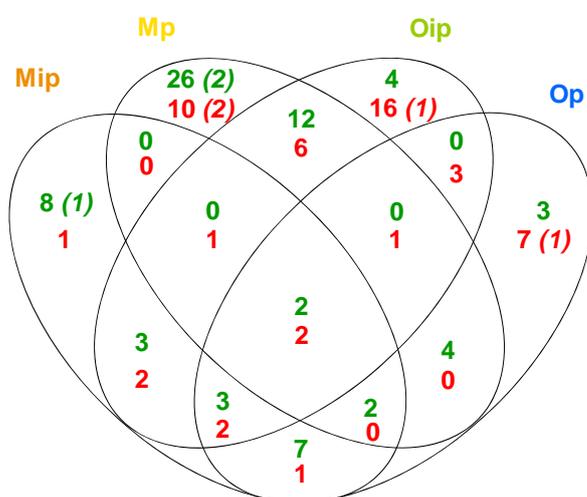
### 2.1.2. Adenocarcinomas Mamarios.

El número de genes diferencialmente expresados en relación al grupo control en adenocarcinomas mamarios se muestra en la Figura 110. El número total de secuencias moduladas fue inferior del hallado en glándula mamaria a la misma edad (246 días), excepto en el grupo O<sub>IP</sub>.



**Figura 110.** Número de genes diferencialmente expresados en adenocarcinomas mamarios de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica respecto al grupo control al final del estudio. En verde se indican los genes infraexpresados y en rojo los genes sobrexpresados.

En cuanto a los genes específicos o comunes,  $M_P$  destacó por el número de genes hallados exclusivamente en este grupo, seguido de  $O_{IP}$ . En general, se hallaron muy pocos genes comunes entre los grupos, y únicamente 4 de ellos fueron diferencialmente expresados en todos los grupos de dieta hiperlipídica (Figura 111).



**Figura 111.** Diagramas de Venn de genes específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica en adenocarcinomas mamarios al final del estudio. Las intersecciones indican los genes compartidos en 2, 3 o los 4 grupos de dieta hiperlipídica. En verde se indica el número de genes conocidos infraexpresados y en rojo los sobrexpresados. Entre paréntesis se indican las secuencias no identificadas.

## 2.2. Categorías Funcionales de los Genes Diferencialmente Expresados por Efecto de los Lípidos de la Dieta.

Los genes diferencialmente infra- o sobreexpresados fueron clasificados por su función en procesos biológicos según la base de datos Gene Ontology (GO), y se determinaron las categorías significativamente sobrerrepresentadas. Dicho análisis funcional se realizó, por un lado, con el total de genes modulados en cada grupo de dieta hiperlipídica, y por otro lado, en los subgrupos de genes comunes y específicos. En las Anexo Tabla 35, 36, 37 y 38 se detallan los genes pertenecientes a las categorías funcionales sobrerrepresentadas más relevantes.

### 2.2.1. Glándula Mamaria.

El análisis funcional de los genes diferencialmente expresados por las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria a diferentes edades se detalla en la Tabla 23.

**Tabla 23. Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas en los genes infra- y sobreexpresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria a diferentes edades.**

Día/grupo	Categoría funcional	Clasificación GO	n	hyp (p-valor)		
<b>Glándula Mamaria: 36 días</b>						
<b>M<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Respuesta a estímulos externos y a estrés	GO:0006950, GO:0051716, GO:0009605, GO:0009628, GO:0009607	21(154)	2,74E-03	
		Respuesta inmune	GO:0006955	21(154)	1,65E-10	
		Muerte celular	GO:0008219	14(154)	1,18E-02	
		Desarrollo	GO:0048856, GO:0007275	23(154)	3,95E-04	
		Proliferación celular	GO:0008283	13(154)	4,63E-03	
		Proceso catabólico	GO:0009056	13(154)	7,34E-04	
		Movimiento componentes celul.	GO:0006928, GO:0030030	5(154)	1,66E-02	
		Adhesión celular	GO:0007155	9(154)	1,07E-04	
		Organización celular	GO:0006996, GO:0030029, GO:0007017	11(154)	8,63E-04	
		<b>Genes sobreexpresados</b>	Respuesta a estímulos externos	GO:0009605	5(33)	9,33E-04
Crecimiento	GO:0035264		3(33)	2,74E-04		
<b>O<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Metabolismo	GO:0055114, GO:0006066	14(67)	4,89E-05	
		<b>Genes sobreexpresados</b>	Respuesta a estímulos externos y abióticos	GO:0009605, GO:0009628	8(53)	1,10E-03
			Adhesión celular	GO:0007155	6(53)	4,25E-04
			Procesos basados en filamentos de actina	GO:0030029	3(53)	1,50E-02

GO: Go Ontology; n: número de genes pertenecientes a la categoría, entre paréntesis se indica el total de genes analizados; hyp (p-valor): significación estadística (test hipergeométrico).

Tabla 23. Continuación.

Día/grupo	Categoría funcional	Clasificación GO	n	hyp (p-valor)	
<b>Glándula Mamaria: 51 días</b>					
<b>M<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Metabolismo	GO:0055114, GO:0006066	22(120)	1,59E-08
		Crecimiento	GO:0035264	4(120)	1,18E-03
		Respuesta celular a estímulos	GO:0051716	8(120)	1,56E-02
		Respuesta a estímulos externos y bióticos	GO:0009605, GO:0009607	12(120)	2,97E-03
		Muerte celular	GO:0008219	9(120)	2,97E-02
		Producción de citocinas	GO:0001816	5(120)	1,82E-03
<b>O<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Metabolismo	GO:0055114, GO:0006066	23(98)	8,13E-12
		Crecimiento	GO:0035264	4(98)	5,55E-04
		Respuesta estímulos externos	GO:0009605	13(98)	1,37E-04
		Producción de citocinas	GO:0001816	4(98)	5,64E-03
		Proliferación celular	GO:0008283	7(98)	4,10E-02
		<b>Glándula Mamaria: 100 días</b>			
<b>O<sub>P</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Metabolismo	GO:0006066	3(34)	4,65E-02
		Respuesta estímulos externos	GO:0009605	5(34)	1,06E-02
		Respuesta celular a estímulos	GO:0051716	4(34)	1,26E-02
<b>Glándula Mamaria: 246 días</b>					
<b>M<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Respuesta estímulos externos	GO:0009605	15(135)	3,31E-04
		Muerte celular	GO:0008219	10(135)	2,46E-02
		Metabolismo	GO:0006066, GO:0055114	18(135)	3,78E-05
<b>M<sub>P</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Respuesta estímulos externos	GO:0009605	16(94)	8,70E-02
		Muerte celular	GO:0008219	11(94)	5,55E-04
		Proliferación celular	GO:0008283	7(94)	3,34E-02
		Metabolismo	GO:0006066, GO:0055114	17(94)	7,43E-06
		Crecimiento	GO:0035264	4(94)	4,34E-04
<b>O<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Metabolismo	GO:0006066, GO:0055114	10(43)	5,00E-03
		Respuesta estímulos externos	GO:0009605	5(43)	2,75E-02
		Crecimiento	GO:0035264	3(43)	6,03E-04
<b>O<sub>P</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Metabolismo	GO:0006066, GO:0055114	18(78)	2,50E-08
		Respuesta estímulos externos	GO:0009605	9(78)	3,79E-03
		Crecimiento	GO:0035264	4(78)	2,32E-04
		Muerte celular	GO:0008219	8(78)	6,95E-03

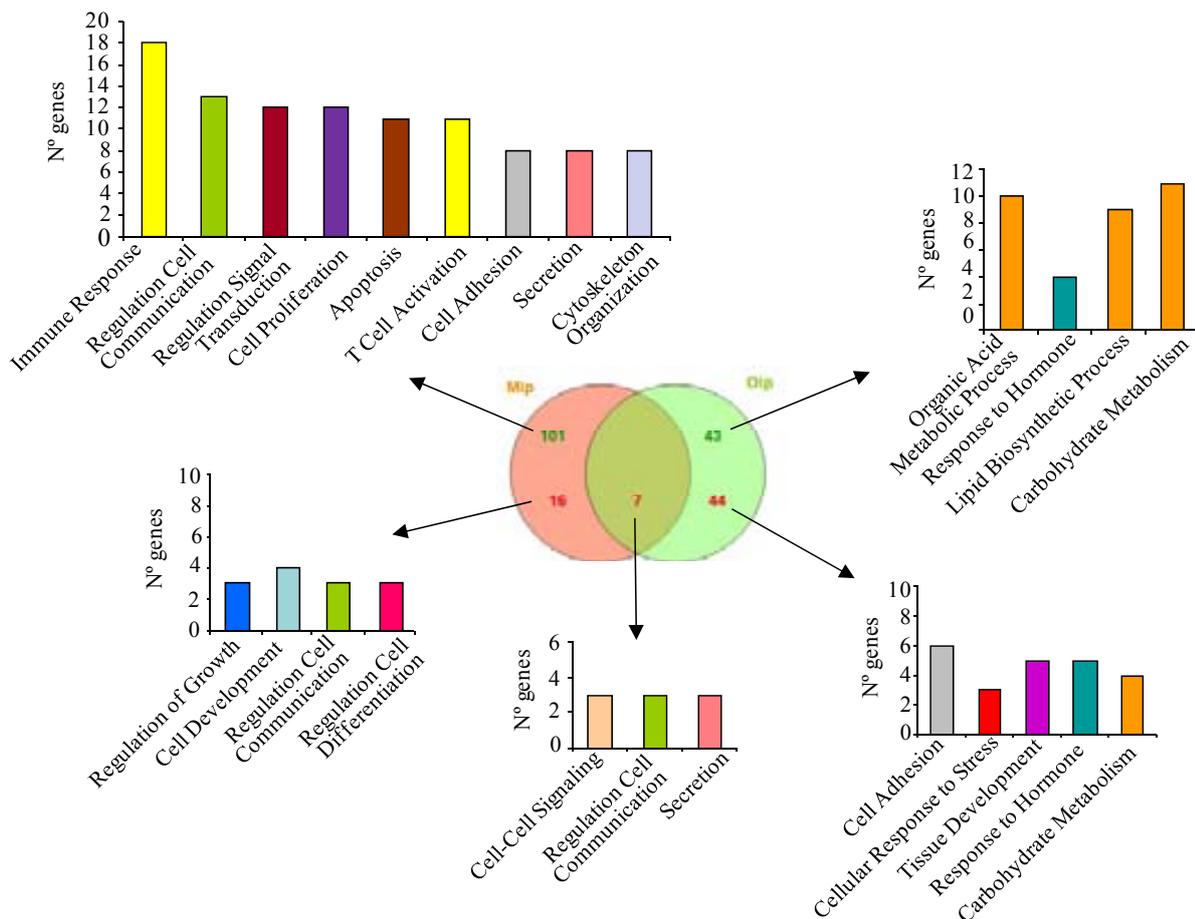
GO: Go Ontology; n: número de genes pertenecientes a la categoría, entre paréntesis se indica el total de genes analizados; hyp (p-valor): significación estadística (test hipergeométrico).

Algunas de las funciones significativamente sobrerrepresentadas fueron halladas de forma generalizada, en varias edades y en diferentes grupos. Tal fue el caso de funciones relacionadas con el metabolismo, respuesta a estímulos o crecimiento. 36 días fue la edad con unos resultados más característicos por grupo. Así, a esta edad, los genes infraexpresados en M<sub>IP</sub> estaban relacionados con la respuesta inmune, la muerte celular, la proliferación y la adhesión, mientras que O<sub>IP</sub> también presentaba genes con un papel en la adhesión celular, pero dichos genes estaban sobreexpresados.

## Resultados

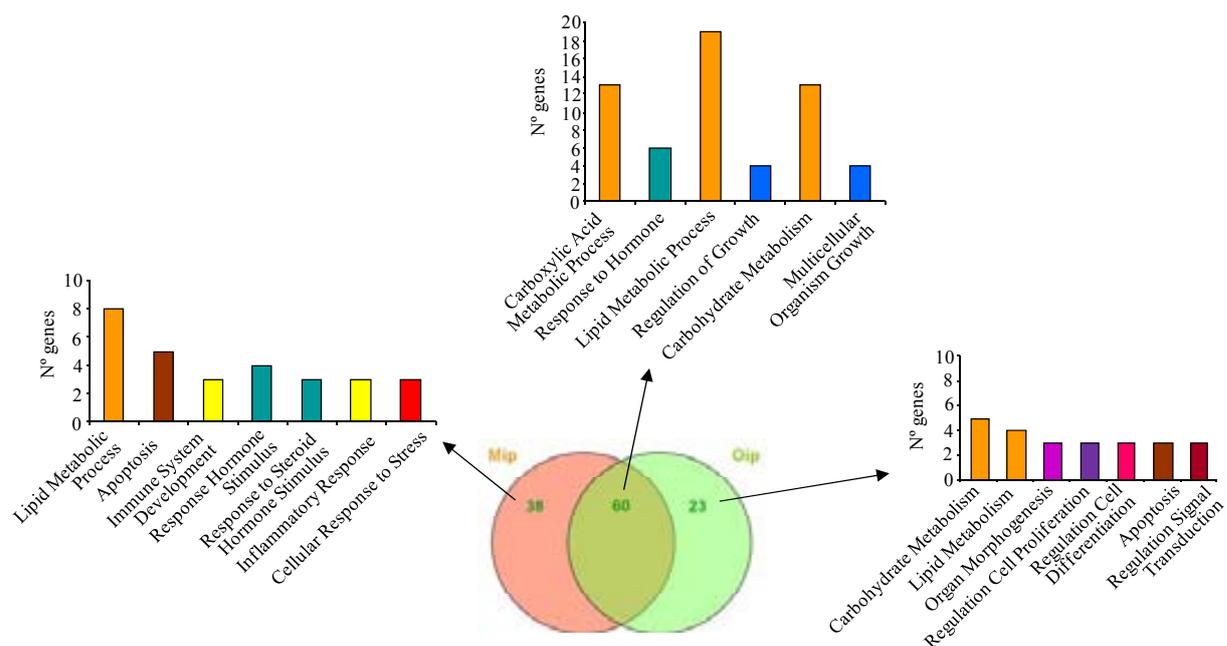
Otras funciones como la proliferación y la muerte celular fueron halladas a diferentes edades, aunque ésta última fue mayoritariamente destacada en los genes infraexpresados de los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz.

Por otro lado, en las Figuras 112-114 se detallan las categorías funcionales destacadas en los subgrupos de genes específicos y comunes. A los 36 días de edad, los genes infraexpresados por efecto de la dieta de aceite de oliva virgen extra estaban mayoritariamente relacionados con el metabolismo, mientras que los de la dieta de aceite de maíz estaban implicados en varias funciones tales como el sistema inmune, transducción de señales, proliferación y apoptosis. En cuanto a los genes sobreexpresados, tanto específicos como comunes, estos pertenecieron a diversas categorías funcionales que incluyen desarrollo y comunicación celular. Todas ellas se hallan detalladas en la Figura 112.



**Figura 112. Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria a los 36 días de edad.** En verde se indica el número de genes infraexpresados y en rojo los sobreexpresados.

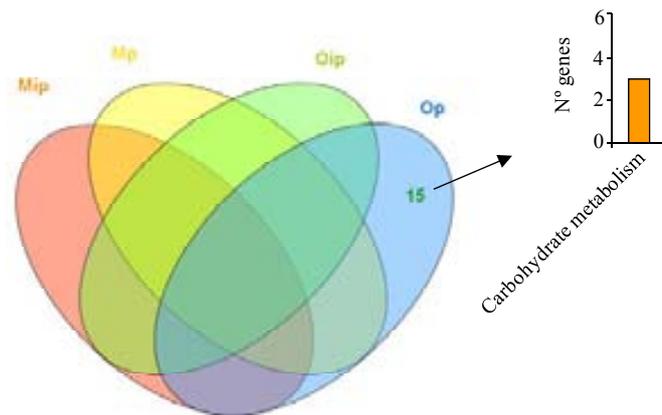
Por otro lado, a los 51 días, el número de genes modulados a la baja de forma conjunta por ambas dietas aumentó notablemente, y estos estaban implicados mayoritariamente en funciones metabólicas (Figura 113). Entre los genes infraexpresados específicos también se hallaron funciones metabólicas, entre otras. Cabe destacar que a esta edad, de la misma forma que a los 36 días, entre los genes infraexpresados específicos de M<sub>IP</sub> se hallaron genes del sistema inmune y apoptosis.



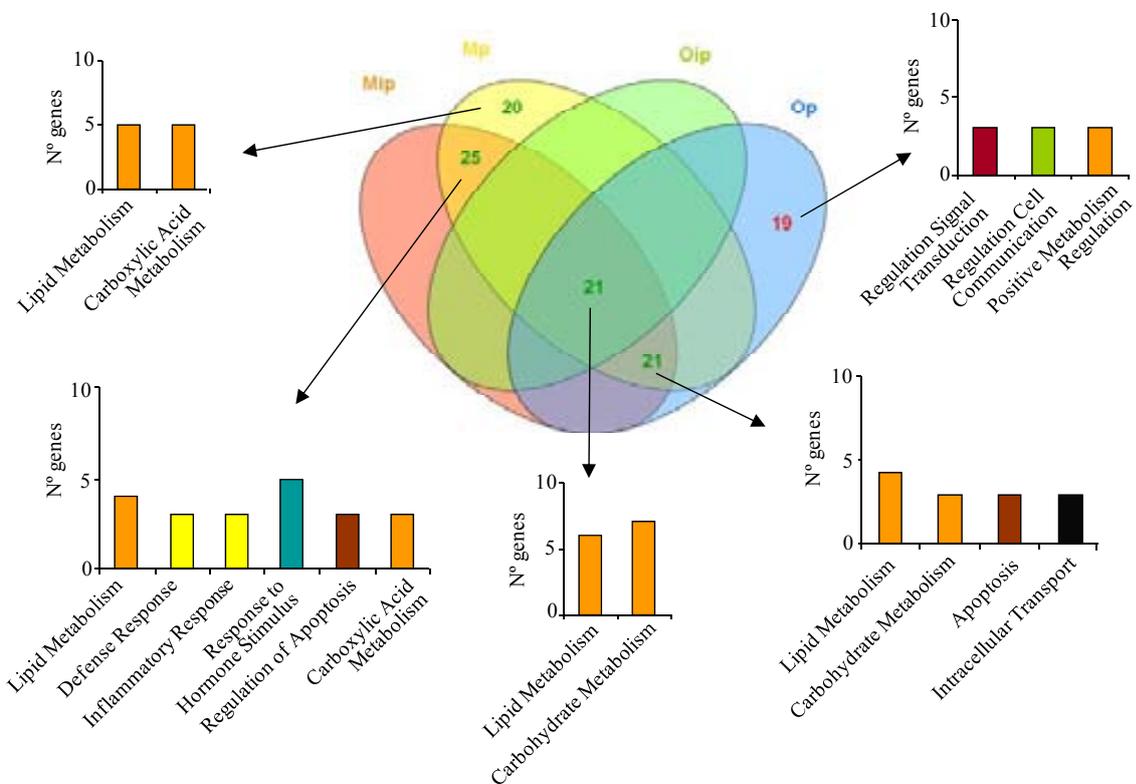
**Figura 113. Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria a los 51 días de edad.** En verde se indica el número de genes infraexpresados y en rojo los sobrexpresados.

Dado el bajo número de genes diferencialmente expresados a los 100 días de edad inicialmente, se hallaron funciones sobrerrepresentadas (metabolismo) en los genes infraexpresados en el grupo O<sub>P</sub> por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra (Figura 114A). Finalmente, a los 246 días de edad, se hallaron funciones del metabolismo de glúcidos y lípidos tanto en genes comunes como en específicos. Nuevamente, los genes infraexpresados en los grupos de dieta hiperlipídica PUFA n-6 (comunes en los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>) estuvieron relacionados, entre otros, con el sistema inmune y la apoptosis (Figura 114B).

A



B



**Figura 114. Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en glándula mamaria.** (A) 100 y (B) 246 días de edad. En verde se indica el número de genes infraexpresados y en rojo los sobrexpresados.

### 2.2.2. Adenocarcinomas Mamarios.

Al analizar las funciones de todos los genes que se expresaban diferencialmente en adenocarcinomas mamarios de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica, respecto al grupo control, se observaron categorías sobrerrepresentadas en varios grupos de forma general, tales como metabolismo, respuesta a estímulos o proliferación y ciclo celular. Por otro lado, algunas funciones fueron más características del grupo experimental. Así, por ejemplo, se encontraron

genes pertenecientes al sistema inmune entre los infraexpresados por efecto de la dieta hiperlipídica n-6 (grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>). La muerte celular se halló sobrerrepresentada entre los genes infraexpresados de los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>, así como en los sobreexpresados de los grupos alimentados con dieta de aceite de oliva virgen extra (O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>) (Tabla 24).

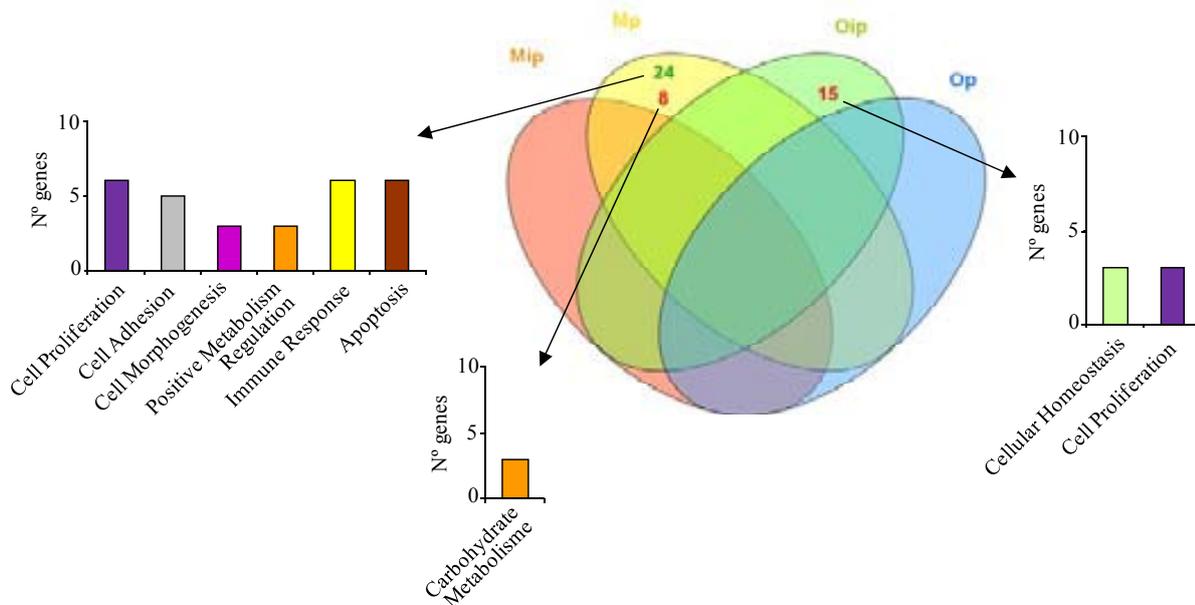
**Tabla 24. Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas en los genes infra- y sobreexpresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en adenocarcinomas mamarios al final del estudio.**

Grupo	Categoría funcional	Clasificación GO	n	hyp (p-valor)	
<b>M<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Desarrollo	GO:0048856,	11(46)	0,034
		Respuesta inmune	GO:0006955	9(46)	6,76E-04
		Metabolismo	GO:0055114, GO:0006066	10(46)	0,022
		Respuesta a estímulos externos y a estrés	GO:0009605, GO:0006950, GO:0009607, GO:0042221	3(46)	4,99E-09
		Muerte celular	GO:0008219	10(46)	1,43E-04
		Ciclo celular	GO:0007049	4(46)	0,001
		Movimiento de componentes celulares	GO:0006928	7(46)	0,028
		Adhesión celular	GO:0007155	8(46)	6,41E-04
<b>M<sub>P</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Desarrollo	GO:0007275, GO:0048856	11(43)	0,037
		Respuesta inmune	GO:0006955, GO:0001775, GO:0001816	9(43)	3,58E-04
		Metabolismo	GO:0055114, GO:0006066, GO:0009056	10(43)	0,042
		Respuesta a estímulos externos y a estrés	GO:0009605, GO:0006950, GO:0042221, GO:0009628, GO:0051716	15(43)	2,96E-08
		Muerte celular	GO:0008219	9(43)	1,34E-03
		Proliferación y ciclo celular	GO:0008283, GO:0007049	9(43)	1,61E-05
		Adhesión celular	GO:0007155	9(43)	1,72E-04
		<b>Genes sobreexpresados</b>	Metabolismo	GO:0006066, GO:0055114	3(18)
<b>O<sub>IP</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Desarrollo y remodelación de tejidos	GO:0007275, GO:0048856, GO:0048771	6(24)	2,03E-04
		Respuesta celular a estímulos	GO:0051716	3(24)	0,002
		Organización de orgánulos	GO:0006996	3(24)	0,016
	<b>Genes sobreexpresados</b>	Metabolismo	GO:0006066	3(33)	0,043
		Respuesta a estímulos externos y a estrés	GO:0009607, GO:0009628, GO:0009605	6(33)	1,72E-03
		Muerte celular	GO:0008219	5(33)	6,15E-03
<b>O<sub>P</sub></b>	<b>Genes infraexpresados</b>	Proliferación celular	GO:0008283	4(33)	0,022
		Respuesta a estímulos externos o abióticos	GO:0009605, GO:0009628	4(17)	3,95E-04
		Proliferación celular	GO:0008283	3(17)	0,0166
	<b>Genes sobreexpresados</b>	Respuesta a estímulos externos	GO:0009605	3(16)	0,024
		Muerte celular	GO:0008219	3(16)	0,0184
		Proliferación celular	GO:0008283	5(16)	1,17E-04

GO: Go Ontology; n: número de genes pertenecientes a la categoría, entre paréntesis se indica el total de genes analizados; hyp (p-valor): significación estadística (test hipergeométrico).

## Resultados

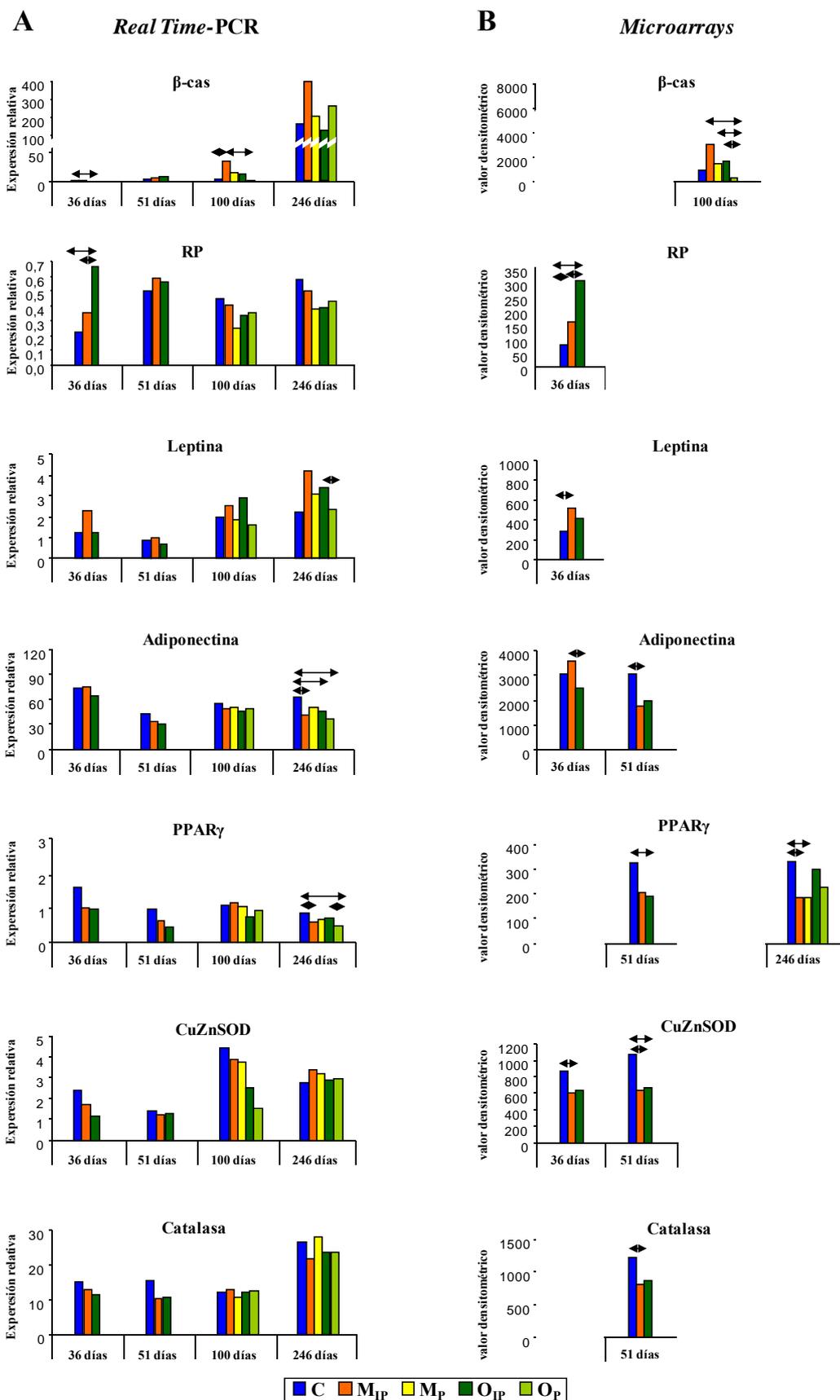
En cuanto al análisis funcional de los genes comúnmente modulados o específicos de cada grupo, tan sólo se hallaron categorías enriquecidas en los grupos M<sub>P</sub> y O<sub>IP</sub> (Figura 115). De la misma manera que en glándula mamaria, en los adenocarcinomas también se hallaron grupos de genes infraexpresados, exclusivos del grupo M<sub>P</sub>, relacionados con el sistema inmunológico y la apoptosis.



**Figura 115. Categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas de los genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas en adenocarcinomas mamarios al final del estudio.** En verde se indica el número de genes infraexpresados y en rojo los sobrerrepresentados.

### 2.3. Validación del Estudio del Perfil de Expresión Génica.

En primer lugar se compararon los resultados de los genes cuya expresión había sido previamente objeto de estudio mediante *Real Time*-PCR con los obtenidos para dichos genes en la determinación del perfil de expresión génica mediante *Microarrays* en muestras de glándula mamaria. A pesar de las diferencias en los tratamientos estadísticos y de las significaciones estadísticas entre los dos tipos de ensayos, los perfiles de expresión obtenidos mostraron similitudes entre las dos técnicas (Figura 116).

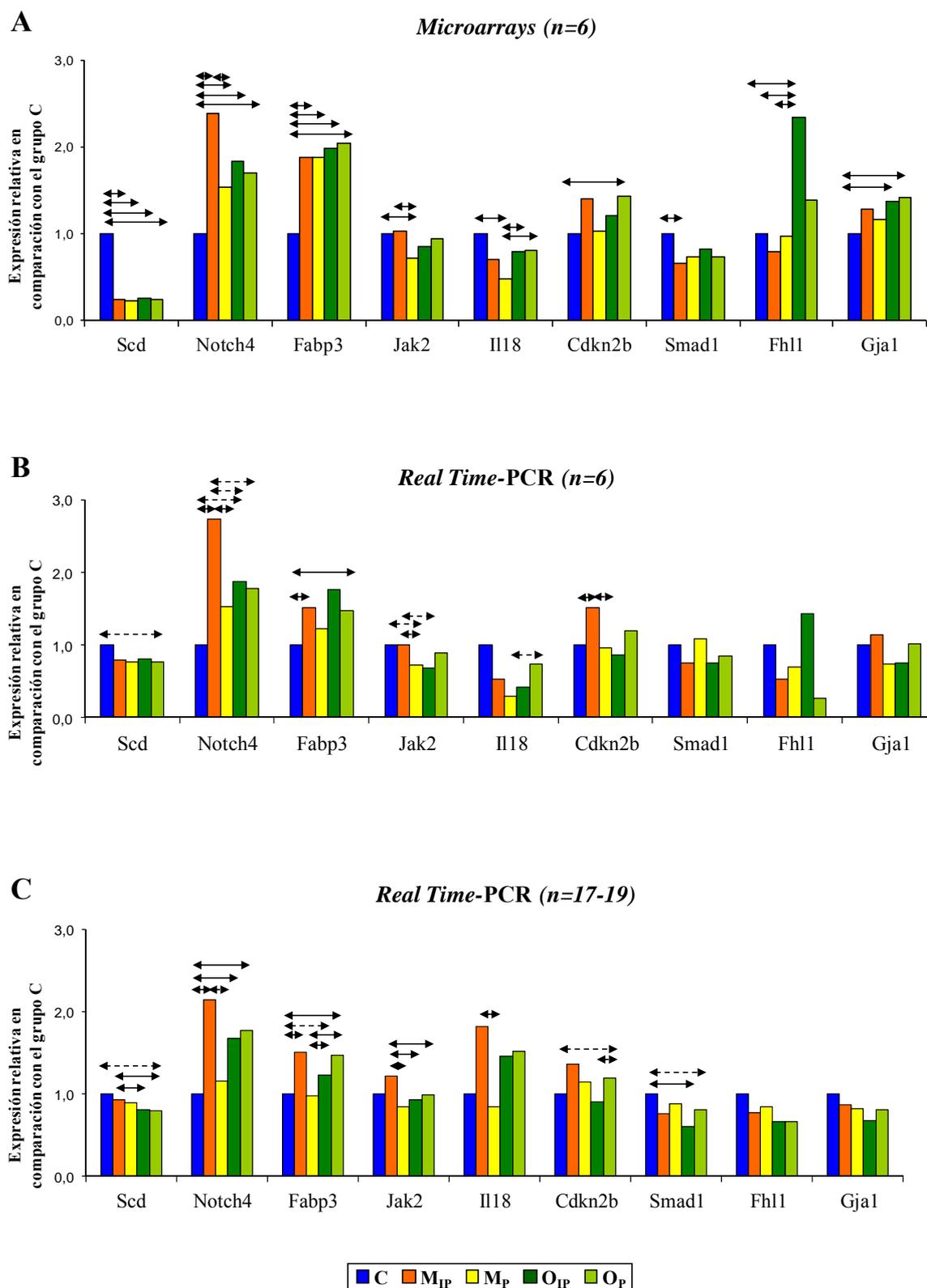


**Figura 116.** Análisis de la expresión por *Real Time-PCR* (A) (expresión relativa respecto al transcrito control *Hprt*, -mediana-) y por *Microarrays* (B) (valor densitométrico, -media-) en glándula mamaria. En el caso de los *Microarrays* se destaca únicamente aquellas edades en las que se han obtenido los genes de interés entre los diferencialmente expresados. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente se eligieron 9 genes de los obtenidos como diferencialmente expresados en adenocarcinomas mamarios, para analizar su expresión por *Real Time*-PCR. Entre los genes elegidos se incluyeron genes comúnmente infraexpresados (*Scd1*) o sobrepresados (*Notch4* y *Fabp3*) en todos los grupos de dieta hiperlipídica, modulados en un único grupo (*Jak2*, *Il18*, *Cdkn2b*, *Smad1* y *Fhl1*) o en los dos grupos alimentados con dieta de aceite de oliva virgen extra (*Gja1*). Asimismo, dichos genes estaban implicados en funciones como metabolismo (*Scd1* y *Fabp3*), regulación del desarrollo (*Notch4* y *Smad1*), sistema inmune (*Il18*), ciclo celular (*Cdkn2b*) diferenciación (*Fhl1*) o apoptosis (*Jak2* y *Gja1*).

La validación de los resultados obtenidos por *Microarrays* mediante otra técnica de análisis de expresión (*Real Time*-PCR) se realizó en primer lugar en las mismas muestras (n=6/grupo). La comparación de los resultados obtenidos (Figura 117A y B) mostró en general y para la mayoría de genes, un perfil similar entre las dos técnicas, aunque la magnitud de las diferencias así como su significación estadística disminuyó en el caso de la *Real Time*-PCR.

Por otro lado, al ampliar el número de muestras analizadas (Figura 117C), variaron algunas de las tendencias y significaciones obtenidas previamente. En general, se mantuvo la tendencia en la disminución de la expresión de *Scd1* (sobre todo en  $O_{IP}$  y  $O_P$ ) y el aumento de *Notch4* y *Fabp3* (en todas los grupos de dieta hiperlipídica excepto  $M_P$ ). También se mantuvo la tendencia al aumento de expresión en  $O_P$  para el gen *Cdkn2b*. En cuanto al gen *Jak2*, se observó un aumento en  $M_{IP}$  respecto al resto de grupos de dieta hiperlipídica. Por otro lado, se manifestaron nuevas diferencias de expresión en *Il18* (aumento en  $M_{IP}$  respecto  $M_P$ ) y *Smad1* (disminución de expresión en los grupos de aceite de oliva). Por último, no hubo diferencias entre grupos en *Fhl1* y *Gja1*.



**Figura 117. Análisis de expresión por *Microarrays* y *Real Time-PCR* en muestras de adenocarcinomas mamarios al final del estudio.** Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ( $0.05 < p < 0.1$ ). (A) Resultados obtenidos por *Microarrays* (expresión media en cada grupo en relación al grupo control) del análisis de 6 muestras por grupo. (B) Resultados obtenidos por *Real Time-PCR* (mediana de la expresión relativa en comparación al grupo control) en las 6 mismas muestras del análisis de *Microarrays*. (C) Resultados obtenidos por *Real Time-PCR* tras la ampliación del número de muestras analizadas (17-19 muestras por grupo).



INTRODUCCIÓN  
MATERIAL & MÉTODOS  
RESULTADOS  
**DISCUSIÓN**  
CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA



## **A. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL.**

### **1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y MASA CORPORAL.**

Teniendo en cuenta que el **peso corporal** es un buen reflejo del desarrollo de los animales, el estudio de la evolución ponderal mostró la idoneidad de las tres dietas experimentales para producir el crecimiento normal de las ratas del ensayo. Dicho crecimiento fue homogéneo en los 5 grupos experimentales a lo largo del estudio, como reflejó la pequeña magnitud de las diferencias observadas a lo largo del tiempo y el paralelismo de las curvas de evolución ponderal. Además, los coeficientes de variación fueron uniformemente bajos, indicando que no existían diferencias individuales entre los pesos de los animales de un mismo grupo. El estudio del crecimiento de los animales se completó con la determinación de los índices de Masa Corporal (IMC) y de Lee, éste último específico del grado de adiposidad en rata ([839]). Los valores del IMC fueron aumentando uniformemente con la edad en todos los grupos, mientras que el Índice de Lee no varió significativamente a lo largo del tiempo, probablemente debido a las características de la ecuación para su cálculo, en la cual se disminuye la importancia del parámetro que más varía (peso corporal).

Por otra parte, cabe destacar que la ausencia de patologías significativas halladas en las exploraciones realizadas sistemáticamente a lo largo del ensayo permitió descartar que se produjeran alteraciones por desequilibrios nutricionales ([827], [905], [5742]). Por tanto, las diferencias que pudieran observarse en todos los parámetros analizados en este trabajo podrían ser atribuidas a cambios producidos por la variable dieta, y no a factores inespecíficos resultantes de dichos desequilibrios.

En conclusión, los resultados obtenidos del correcto crecimiento de los individuos junto con la ausencia de patologías reflejaron la idoneidad de las dietas para realizar el estudio, de manera que ni la dieta ni otros factores experimentales ejercieron un efecto inespecífico sobre los resultados, ni selectivo sobre los individuos. En caso contrario, los animales se hubieran adaptado, aumentando así la variabilidad de las respuestas individuales.

Un segundo aspecto a tener en cuenta es el posible efecto diferencial de los dos tipos de dieta hiperlipídica sobre el peso y la masa corporal. En este sentido, el grupo M<sub>IP</sub>, alimentado con dieta hiperlipídica de aceite de maíz (M20) desde el destete, mostró un aumento significativo de la evolución ponderal, así como del IMC e Índice de Lee al final del estudio. En cambio, el grupo alimentado también desde el destete con dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra (mO20) presentó unos valores similares al grupo control en dichos

parámetros. Otros autores también han descrito un efecto diferencial sobre el peso corporal en función del tipo de grasa de la dieta. Así, estudios en modelos en rata describen un aumento del peso por efecto de una dieta hiperlipídica de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) n-6 en comparación con la dieta control ([945], [5423]). En cuanto al efecto de las dietas hiperlipídicas de aceite de oliva, hay pocos datos en la literatura. En ratas ha sido descrito que la administración de una dieta rica en aceite de oliva virgen extra durante 28 días produce una disminución del peso corporal comparado con una dieta hiperlipídica de aceite de maíz ([6827]). Por otro lado, estudios epidemiológicos que han analizado los efectos beneficiosos de una dieta con un contenido relativamente elevado de aceite de oliva, concluyen que dicha dieta no provoca un aumento del peso corporal ([7493]). Además, en otros estudios en humanos se ha relacionado el consumo durante 4 semanas de una dieta hiperlipídica de ácidos grasos saturados (40% de la energía total) con un aumento del peso corporal, mientras que la dieta hiperlipídica basada en aceite de oliva se relacionó con una disminución de dicho peso ([7482]). Esta disminución también ha sido descrita en otros estudios al comparar el efecto de distintos tipos de dieta hiperlipídica a lo largo de dos años ([7494]). Los resultados obtenidos en este trabajo, así como los diversos datos de la literatura, ponen en evidencia que, además de la cantidad de grasa total ingerida, existe un aspecto cualitativo en el mantenimiento del peso corporal, relacionado con el tipo de lípido consumido.

Los mecanismos mediante los cuales las dietas ejercerían este efecto diferencial podrían estar relacionados directamente con el tipo de grasa administrada, ya que se ha descrito que la estructura de los ácidos grasos, la longitud de la cadena, el grado de insaturación, la posición y la configuración de los dobles enlaces podrían afectar al destino metabólico de las grasas ([7475]). En este sentido se ha asociado la ingesta de una dieta rica en aceite de oliva con el aumento de la tasa de oxidación de los ácidos grasos ([7482]) y de la termogénesis como consecuencia del catabolismo de los triacilglicéridos ([6827]). Por otro lado, se ha sugerido que el aceite de oliva podría ejercer un efecto aumentando la sensación de saciedad. De la misma manera, se ha postulado que los efectos de dicho aceite sobre la saciedad y el peso vendrían dados por la molécula Oleiletanolamida (OEA), la cual es sintetizada a partir del ácido oleico. Se ha descrito que esta molécula lipídica está involucrada en la disminución de la ingesta actuando sobre el hipotálamo como anorexígeno. Además, actuaría a nivel periférico sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa, por ejemplo, promoviendo la movilización y oxidación de los ácidos grasos o activando a genes relacionados con proteínas de transporte de lípidos ([7168], [7178], [7206]). Una de las principales dianas de la OEA es un miembro de la familia de los Receptores Activados

por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR), los cuales regulan la expresión de genes relacionados con el transporte de ácidos grasos y su  $\beta$ -oxidación, el depósito de lípidos y la diferenciación de los adipocitos ([3555], [7475]). Concretamente, la OEA activaría el receptor PPAR $\alpha$ , el cual induciría la expresión de dicho tipo de genes del metabolismo lipídico ([7168], [7179], [7210]).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de la evolución ponderal, en relación a los mecanismos por los cuales las dietas experimentales podrían ejercer un efecto diferencial sobre el peso y masa corporal, se inició el estudio de la expresión de **genes implicados**, directa o indirectamente, con la **metabolización de los ácidos grasos**. Así, se analizó la expresión en hígado de PPAR $\alpha$  y dos transportadores directamente activados por dicho receptor, la Carnitina Palmitoil Transferasa tipo 1 $\alpha$  (CPT-1a), facilitadora del transporte de los ácidos grasos de cadena larga a la membrana mitocondrial externa donde serán utilizados para la  $\beta$ -oxidación ([7516], [7528]), y la proteína de unión a ácidos grasos en hígado (L-FABP), la cual está implicada en la captación y el transporte de ácidos grasos al hígado para su posterior  $\beta$ - y  $\alpha$ -oxidación ([7527], [7528]). Por último, a partir de los resultados obtenidos en el cribado de genes diferencialmente expresados por los lípidos de la dieta en glándula mamaria (véase Resultados, subapartado C.2), se planteó la posibilidad que dichas dietas modificaran otros genes activados por PPAR $\alpha$  y relacionados con el balance depósito/gasto de energía. Entre todos ellos destacó, por sus propiedades, el de la proteína desacopladora tipo 2 (UCP-2). Dicho gen se halla implicado en el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la disipación de energía en forma de calor ([7495]). Una función de esta naturaleza podría estar relacionada con el mantenimiento del peso corporal en los animales alimentados con dieta rica en aceite de oliva virgen extra y por este motivo se analizó también su expresión relativa en hígado, tejido entre todos los disponibles en el estudio que podría estar más relacionado con el mecanismo descrito.

El análisis de la expresión en hígado de PPAR $\alpha$  mostró pocas diferencias significativas, indicando un aumento de expresión en los grupos de dieta hiperlipídica a 100 días, así como un aumento al final del ensayo de la expresión en el grupo M<sub>IP</sub>, alimentado con dieta M20. La expresión en el mismo tejido de CPT-1a también fue superior en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica en todas las edades, y en el caso de M<sub>IP</sub>, también respecto a los grupos alimentados con dieta mO20 al final del estudio. En la literatura existen resultados controvertidos en relación al efecto de las dietas hiperlipídicas sobre la expresión de estos genes. Se ha descrito una disminución de los niveles de expresión en hígado de ambos genes en un modelo en hámsters alimentados con una dieta hiperlipídica de una mezcla de grasas monoinsaturadas (MUFA), entre las que se hallaba el aceite de oliva ([7530]). Otro trabajo en el

mismo sentido es el realizado en ratas alimentadas durante 3 semanas con una dieta hiperlipídica de aceite de maíz ([7529]). Según los autores, la disminución de la expresión de PPAR $\alpha$  y CPT-1a, se relacionaría con una menor tasa de oxidación de los ácidos grasos, y por lo tanto, con su acumulación en el tejido hepático ([7529]). No obstante, en la literatura también se ha asociado una alta capacidad metabólica de ácidos grasos con un aumento de la expresión en hígado de CPT-1a en ratas alimentadas durante 8 semanas con una dieta hiperlipídica de soja y manteca al 54% de la energía total ([7532]). La disparidad de resultados podría estar relacionada, además de con el tipo de dieta, con los distintos diseños experimentales, la cepa utilizada o el sexo de los animales ([7531], [7532]).

Los resultados obtenidos del estudio de L-FAPB en hígado revelaron un aumento de su expresión en todos los grupos de dieta hiperlipídica a lo largo de todo el estudio. En otros trabajos se ha descrito también un aumento de dicha expresión en ratas alimentadas con dietas con un 54% de la energía proveniente de grasas mezcla de MUFA y de grasas saturadas ([7532]). Esta elevada expresión se ha asociado con una gran capacidad de metabolizar ácidos grasos en hígado ya que la proteína transportadora L-FAPB está relacionada con la rápida movilización y oxidación de ácidos grasos ([7527]).

Finalmente se estudió, también en hígado, la expresión de UCP-2. El análisis mostró un aumento de dicha expresión a los 36 días de edad en el grupo O<sub>IP</sub>, alimentado con dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra desde el inicio del estudio. Asimismo se observó un aumento de la expresión a los 100 y 246 días en los grupos de dieta hiperlipídica, siendo mayor la expresión en el grupo O<sub>P</sub>. Estos resultados son compatibles con datos hallados en la literatura, donde se describe una activación específica de UCP-2 por el ácido oleico en un modelo *in vitro* en hepatocitos ([7533]). Asimismo, se ha observado un aumento de la expresión de este gen en tejido adiposo y músculo esquelético en animales alimentados durante cuatro semanas con dieta rica en aceite de oliva (40% de la energía total) respecto a las otras dietas hiperlipídicas basadas en ácidos grasos polinsaturados ([7534]). Por otro lado, se ha descrito un aumento de la expresión de este gen en animales alimentados con una dieta enriquecida con fructosa durante 21 días, lo cual se ha relacionado con la necesidad de compensar la sobrecarga metabólica generada disipando la energía en forma de calor ([7535]). Estos datos concordarían con los obtenidos en este estudio, donde el mantenimiento del peso corporal, a pesar de administrar una dieta con alto contenido en aceite de oliva, podría deberse, al menos en parte, a un aumento de la expresión de UCP-2 que comportaría un incremento de la disipación de energía.

En conclusión, los resultados derivados del estudio sugieren un efecto diferencial de las dietas experimentales. La administración en exceso de grasas ricas en PUFA n-6 se asociaría a un aumento de peso y masa corporal. Por el contrario, la dieta mO20, a pesar de contener el mismo porcentaje de lípidos que la hiperlipídica de aceite de maíz, no aumentaría dicho parámetro, lo que indica la importancia no sólo de la cantidad, sino también del tipo de lípido ingerido en el mantenimiento del peso corporal. Los resultados de este trabajo, junto con los descritos en la literatura ([7178], [7475], [7534], [7535]), sugieren un efecto diferente según el tipo de lípido sobre el metabolismo y el equilibrio gasto/depósito (aumento de la disipación de energía y disminución del almacenamiento en el caso del aceite de oliva). Aunque los estudios en animales deben ser extrapolados a humanos con precaución, estos datos están en concordancia con distintos estudios epidemiológicos que han observado que la dieta mediterránea, cuya principal fuente de energía es el aceite de oliva, puede tener un efecto protector contra la obesidad ([7482], [7493]). En cualquier caso, destacan la importancia que adquieren los hábitos dietéticos que se adoptan desde una temprana edad.

## 2. PUBERTAD.

Para el estudio del **inicio de la pubertad** se analizaron los cambios clínicos en la morfología vaginal que preceden a su apertura, como indicador del inicio del ciclo estral, y, por lo tanto, de la maduración sexual. Para ello, previamente se definieron 4 estados de maduración en función de la apariencia de los labios y del estado del orificio vaginal. Así, entre los días 30 y 52 de edad se caracterizó el estado de maduración de cada animal otorgándoles una categoría del 0 (estado más inmaduro) al 3 (apertura vaginal y estado sexualmente maduro). Este estudio mostró que los animales llegaron a cada uno de los estados en días diferentes, siendo los grupos de dieta hiperlipídica, especialmente el alimentado con dieta de aceite de maíz (PUFA n-6), los que alcanzaron antes los distintos estados de maduración. El avance de la pubertad también ha sido descrito por efecto de una dieta hiperlipídica n-6 ([5428]), así como por diferentes dietas ricas en PUFA n-6 y ácidos grasos saturados de origen animal y vegetal ([934]). Por otro lado, una dieta hiperlipídica n-3 de aceite de pescado provocó un retraso en el día de apertura vaginal ([5426]). Según la información disponible por el equipo investigador, éste es el primer trabajo publicado en el que se ha estudiado el efecto del aceite de oliva sobre el inicio de pubertad ([6887], [7375]).

Asimismo, se analizó el **peso de los animales** al alcanzar cada uno de los estados de maduración, no encontrándose diferencias significativas por efecto de las dietas experimentales. Por lo tanto, los animales presentaban un peso corporal similar cuando alcanzaban los distintos estados. Los resultados sugieren que es necesario llegar a un determinado peso y un cierto grado de tejido adiposo, entre otros factores, para que se inicie la pubertad, tal y como ha sido descrito por otros autores ([5423], [5795], [5797]). Por el contrario, la comparación del peso de los animales de la misma edad cronológica (en el día real, independientemente del estado de maduración) mostró un aumento de éste por efecto de las dietas hiperlipídicas, especialmente la rica en PUFA n-6, que fue la única que presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Este hecho, junto con los resultados de la apertura vaginal, indicarían que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz avanza la maduración sexual adelantando el crecimiento del animal.

En cuanto al estudio del tiempo de evolución entre los distintos estados (1→2, 2→3 y 1→3), no se encontraron diferencias significativas entre grupos. Esto sugiere que, las dietas no modificarían el proceso fisiológico de maduración, de manera que la duración entre estados es siempre la misma independientemente del día de inicio. De igual manera, el estudio de otro parámetro clásico del inicio de la pubertad, el tiempo transcurrido entre el día de apertura vaginal y el primer estro ([7536]), tampoco reveló diferencias por efecto de las dietas.

Por otro lado, se realizó un estudio histológico para determinar la **función ovárica y endometrial**. Así, al analizar las muestras de ovario, se observó un mayor número de cuerpos lúteos en el grupo M<sub>IP</sub> a los 51 días de edad. Estos resultados sugerirían una mayor actividad ovárica, en cuanto a número de oocitos maduros liberados, en los animales de este grupo. Análogamente otros trabajos describen la misma situación en animales alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz (PUFA n-6) al 21% de energía, mientras que animales alimentados con dieta al 21% de aceite de pescado (PUFA n-3) presentaron un retraso en la apertura vaginal y una disminución de los cuerpos lúteos ([5426]). En cuanto al estudio de la actividad endometrial, los resultados mostraron un endometrio inactivo en todos los animales de 24 días de edad, mientras que a partir de los 51 días el endometrio fue activo en todos los animales, independientemente del grupo. A los 36 días, los grupos de dieta hiperlipídica presentaron un mayor porcentaje de animales con endometrio activo en relación al grupo control. Por consiguiente, la mayor actividad endometrial y el mayor número de cuerpos lúteos de los animales alimentados con dieta hiperlipídica, especialmente los del grupo M<sub>IP</sub>,

sugerirían un aumento de la fertilidad en dichos animales asociada a un avance de la maduración sexual.

La **caracterización molecular** del inicio de la pubertad se realizó, en primer lugar, mediante el estudio de la expresión hipotalámica de Kisspeptina y su receptor, el GPR54. Se ha descrito que esta proteína, producto del gen kiss-1, está implicada en el inicio de la pubertad, el control neuroendocrino de la ovulación y, además, desencadenaría a nivel metabólico la función reproductora ([5869]). Asimismo, estudios realizados en rata revelan unos niveles de expresión de kiss-1 en hipotálamo muy bajos en edades pre-puberales que, posteriormente, aumentan hasta alcanzar unos niveles máximos en la pubertad ([5828], [5829]). En este sentido, el análisis de los resultados de este estudio reveló que, a los 36 días de edad, en el grupo de dieta M20 los niveles de ARNm de Kisspeptina aumentaron en relación al grupo control, mientras que los niveles de GPR54 no reflejaron diferencias significativas en esta edad ni a lo largo del estudio. El aumento observado de Kisspeptina estaría relacionado con el adelanto del inicio de la pubertad, ya que la expresión de Kisspeptina desencadena el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, con el consecuente pico pre-ovulatorio de LH ([5869]). Por otro lado, a partir de los 51 días, los resultados de Kisspeptina y su receptor fueron muy heterogéneos, lo que podría estar relacionado con las distintas fases del ciclo estral en la cual se encontraban los animales en el día de sacrificio, ya que existen evidencias de que los niveles de ARNm de Kiss-1 en hipotálamo dependen de la fase del ciclo estral. Así, se han observado niveles máximos de ARNm en fase de diestro ([5828]) mientras que otros autores han referido la máxima expresión de la proteína durante el proestro ([5900], [6003]).

Para completar el estudio de la maduración sexual, se analizaron los niveles plasmáticos de la proteína Leptina y la expresión de su receptor ObR en hipotálamo. Esta proteína es una de las principales responsables de informar al sistema nervioso central del estado nutricional y las reservas energéticas, además de estar relacionada con la regulación de la ingesta ([5795], [5797]). Los resultados del estudio mostraron una mayor cantidad de Leptina en plasma a los 51 días en el grupo control, mientras que el grupo M<sub>IP</sub> fue el que mostró mayor expresión en hipotálamo del receptor de Leptina (ObR) a esa misma edad. Estos resultados no reflejarían el avance de la pubertad hallado en el grupo M<sub>IP</sub>. La discrepancia entre estos datos podría ser debida, al menos en parte, a cuestiones metodológicas, ya que se ha descrito una variabilidad en los niveles plasmáticos de Leptina en función de la fase del ciclo estral, así como un patrón diario de secreción con un pico máximo a las 23h ([5798]). Otra posible explicación vendría dada por el hecho que la Leptina es

considerada una señal permisiva pero no indispensable para el inicio de la pubertad y el mantenimiento de la capacidad reproductora en el adulto ([6060]). Los estudios realizados sugieren la implicación de diversas moléculas, junto con la Leptina, en la regulación a nivel hipotalámico de Kisspeptina, como por ejemplo el Neuropéptido Y, Melatonina o Ghrelina ([5869], [6239]). En el caso de la Leptina se ha propuesto que sus niveles periféricos informarían sobre el estado de las reservas energéticas corporales a la vez que modularían la funcionabilidad del eje reproductivo, ya que formarían parte de la regulación a nivel hipotalámico de Kisspeptina ([5869]). Sin embargo, el papel de la Leptina en el inicio de la pubertad no está del todo elucidado. Algunos autores han descrito la co-expresión del receptor de Leptina en las neuronas que expresan Kisspeptina ([5799]), no obstante en otros trabajos no se ha encontrado expresión alguna en dichas neuronas ([6060]). Por otra parte, recientemente se han aportado evidencias del papel de la leptina en el inicio de la pubertad independientemente de Kisspeptina ([7537]).

En definitiva, los resultados obtenidos del estudio de la pubertad, junto a los hallados en el análisis de la evolución ponderal, sugieren un efecto diferente de la dieta rica en PUFA n-6 y de la de aceite de oliva sobre la maduración sexual. Aunque ambas dietas adelantarían la pubertad, este efecto sería superior en el caso de la dieta M20. Así, los animales alimentados con dicha dieta alcanzaron la maduración sexual a una edad más temprana. Tal situación se ha observado en los datos del inicio de la pubertad a nivel clínico con el avance de la apertura vaginal y el aumento de peso corporal, a nivel morfológico con el número de cuerpos lúteos (indicadores de la ovulación) y la actividad endometrial a edades post-puberales y, finalmente a nivel molecular con los niveles hipotalámicos de Kisspeptina en edades próximas al inicio de la pubertad. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos en el estudio de la evolución ponderal, y que indicarían un efecto de la dieta hiperlipídica PUFA n-6 sobre el aumento de peso y la masa corporal. Por el contrario, la dieta mO20, aunque es también hiperlipídica, no aumentaría el peso de los animales, y por lo tanto no adelantaría su crecimiento, lo cual, a partir del estudio realizado en este trabajo con genes del metabolismo, podría estar relacionado con un aumento del gasto de energía. Todos estos resultados son de especial relevancia si se tienen en cuenta diversas evidencias epidemiológicas que han establecido el avance de la pubertad en humanos (menarquia precoz) como factor de riesgo para el cáncer de mama. Dicho avance aumentaría la exposición a estrógenos a lo largo de la vida y el número de ciclos reproductivos en los cuales la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución, lo cual podría influir en que la glándula mamaria sea más

vulnerable a la carcinogénesis ([5975]). En conclusión, los resultados obtenidos en el estudio del crecimiento y la maduración sexual, donde se ha observado un efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas, estarían relacionados con la susceptibilidad de la glándula mamaria a la transformación neoplásica, tal y como se discutirá en el apartado de carcinogénesis.

### 3. ESTADO HORMONAL.

Es un hecho bien conocido la relación existente entre el estado hormonal y la pubertad, debido a que ésta no se produce si el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal no es activado. Asimismo, el aumento, en un determinado momento y de forma característica, de la concentración de estradiol secretado en los ovarios termina por desencadenar el pico de secreción de LH (*feedback* positivo), y en consecuencia se produce la ovulación ([7538]). Además, las hormonas esteroideas sexuales estrógenos y progesterona, entre otras, están implicadas en el desarrollo de la glándula mamaria. Estas hormonas controlan la proliferación y el desarrollo de la glándula directamente y, en el caso de los estrógenos, también indirectamente a través de la acción autocrina y paracrina de factores de crecimiento ([6797]). Por otro lado, es bien sabido que el desarrollo y la progresión del cáncer de mama es hormonodependiente, fundamentalmente a través de los estrógenos, que estimulan la proliferación de las células tumorales mamarias. Así, la mayoría de los factores de riesgo de cáncer de mama se asocian a una estimulación intensa y/o prolongada por hormonas sexuales femeninas. Dentro de los que están relacionados con factores hormonales pueden considerarse los siguientes a nivel endógeno: 1) historia menstrual y reproductiva; 2) menarquia temprana y menopausia tardía; 3) embarazo a término tardío; 4) obesidad. Por otra parte a nivel exógeno se incluirían los tratamientos hormonales y las hormonas ambientales ([4033], [6898], [7786], [7787]).

Teniendo en cuenta el importante papel fisiológico de las **hormonas en la maduración sexual**, se estudió si el diferente efecto modulador de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de aceite de oliva virgen extra en el inicio de la pubertad podría estar mediado, al menos en parte, por cambios en el estado hormonal. Así, se analizaron las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, estradiol y progesterona. Los resultados obtenidos, en general, no mostraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con las distintas dietas hiperlipídicas. Esta ausencia de significación no estaría en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de la caracterización a nivel clínico y molecular del

inicio de la pubertad. Esta discrepancia podría estar relacionada con que las muestras de plasma se obtuvieron en un único día de la fase de maduración (día 36). Además, la naturaleza cíclica de las hormonas dificulta la detección de diferencias, ya que los niveles plasmáticos de todas ellas se hallan muy influidos por la hora del día y por la fase del ciclo estral ([4033]). En definitiva, los resultados de los niveles hormonales en plasma no reflejarían el efecto diferencial de las dietas en la maduración sexual.

Otros factores podrían haber influido en los resultados observados. Así, además de la dificultad del estudio por la complejidad que entraña la regulación endocrina por sí misma, influirían factores metodológicos (sensibilidad del método) y factores relacionados con el diseño experimental, como la obtención de las muestras en fase de diestro, que se caracteriza por unos bajos niveles hormonales ([840], [4033]). Aún así, aunque teóricamente la mayoría de los animales se sacrificaron en diestro, una misma fase del ciclo estral diagnosticada por citología vaginal podría reflejar diferentes niveles hormonales ([4033]).

Los resultados obtenidos en series experimentales anteriores tampoco habían revelado diferencias en los niveles plasmáticos de hormonas por causa de los lípidos de la dieta en ratas adultas ([3950]). Otros autores que han investigado el efecto de la dieta en los niveles hormonales han aportado resultados controvertidos. Así, no se han observado modificaciones en los niveles plasmáticos de las gonadotropinas (LH y FSH) en rata por la ingesta de una dieta rica en ácidos grasos n-3 ([5426]). Por otro lado, se ha descrito un aumento de los niveles de estrógenos por efecto de la ingesta de elevadas cantidades de PUFA (n-6 y n-3), lo que estaría relacionado con el aumento de la concentración de ácidos grasos libres que desplazarían así el estradiol de la albúmina sérica, dejándolo libre para ser captado por su receptor ([6918]). Además, la administración de una dieta hiperlipídica de ácidos grasos n-6 a ratas gestantes ha resultado en un aumento de los niveles plasmáticos de estradiol en algunos trabajos ([3341], [7539]), mientras que en otros, no se han observado modificaciones en dichos niveles ([934], [1077]).

En cuanto al estudio de los **receptores esteroideos**, se analizó la expresión en glándula mamaria de las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  del receptor de estrógenos (RE), así como el receptor de progesterona (RP). Los resultados obtenidos de la expresión de ARNm, tampoco revelaron claras diferencias entre los grupos alimentados con las distintas dietas hiperlipídicas, exceptuando el aumento de expresión de RP en el grupo O<sub>IP</sub> a los 36 días, lo cual podría estar relacionado con el desarrollo de las estructuras lóbulo-alveolares ([3122]). Asimismo, se examinaron los niveles de expresión de la proteína de dichos receptores

estrogénicos por inmunohistoquímica en las distintas estructuras epiteliales previamente identificadas, observándose algunas diferencias significativas. No obstante, las diferencias halladas en este estudio han de ser analizadas con precaución, ya que existe la posibilidad de que la naturaleza de los tests estadísticos utilizados pueda introducir artefactos en las significaciones observadas debido a que la unidad de medida es la propia célula, y por lo tanto, la  $n$  es muy elevada. De todos modos, la imposibilidad de calcular la relación RE  $\alpha/\beta$  en las distintas estructuras epiteliales de las glándulas mamarias dificultó la interpretación de los resultados, por lo que la relevancia de los datos obtenidos sería incierta. Se ha sugerido que dicha relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  sería el factor determinante de la actividad estrogénica, dado las distintas funciones que se han atribuido a cada tipo de receptor. El receptor  $\alpha$  ha sido relacionado con una mayor actividad proliferativa ([6967]), mientras que el receptor  $\beta$  ejercería un papel inhibitorio de la proliferación ([6963], [6967]). En este sentido, la ratio entre los receptores tiene especial importancia ya que asociaría el estado estrogénico y el riesgo de padecer cáncer de mama ([5985],[7540]). Existen evidencias que asocian RE $\alpha$  con un aumento de la proliferación celular y elevado grado histológico tumoral, mientras que RE $\beta$  lo estaría con la diferenciación tumoral ([5099], [5265], [5985]).

La relación entre los lípidos de la dieta y los receptores hormonales en glándula mamaria es un tema no resuelto en la literatura. Algunos autores han hallado un aumento de la expresión proteica de los receptores de estrógenos en glándula mamaria de ratas alimentadas con dieta hiperlipídica PUFA n-6, mientras que los animales cuyas madres fueron alimentadas con la misma dieta durante la gestación, presentaban una disminución de dicha expresión ([3588]). Otros autores no han observado relación alguna entre la alimentación con una dieta hiperlipídica de linaza (PUFA n-3) y la expresión proteica del RE $\alpha$  en glándula mamaria, sin embargo la exposición a dicha dieta en la etapa prenatal promovió un aumento de dicho receptor. Según estos mismos autores, el receptor RE $\beta$  presentaría una disminución de su expresión proteica en la glándula mamaria por efecto de dicha dieta durante la gestación ([5985]).

En conclusión, a pesar de que el avance observado en el inicio de la pubertad por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz debería estar acompañado de cambios hormonales, no se han hallado diferencias en los niveles plasmáticos entre grupos, probablemente debido a la naturaleza cíclica de las hormonas, entre otros factores. En cuanto a los receptores de estrógenos y progesterona en glándula mamaria, no parecen estar influenciados por los lípidos de la dieta, y por lo tanto, la modificación de los niveles de receptores en este tejido no parece ser un mecanismo por el cual los lípidos podrían afectar la

susceptibilidad o resistencia de esta glándula a la transformación neoplásica. En este sentido, debido a la gran implicación de las hormonas y sus receptores en el desarrollo del cáncer de mama, se discutirán los resultados obtenidos de su estudio en los adenocarcinomas mamarios en el apartado de carcinogénesis.

#### 4. CARACTERÍSTICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

La glándula mamaria es un tejido que experimenta un desarrollo y una profunda remodelación durante la pubertad. En este trabajo se estudió la posibilidad de que los lípidos de la dieta, administrados con anterioridad o posteriormente a la pubertad, modificaran la susceptibilidad o resistencia de la glándula mamaria a la transformación neoplásica. El estudio de las distintas estructuras epiteliales es de especial relevancia debido al distinto significado biológico y funcional de las mismas, y por lo tanto podrían reflejar cambios en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Russo *et al.* ([3122], [5967], [5970], [7520]) destacaron la importancia del grado de diferenciación de la glándula en el momento del insulto carcinogénico, ya que las estructuras epiteliales indiferenciadas serían las dianas de transformación maligna. Asimismo, otros autores han descrito la influencia que ejercería una dieta rica en PUFA n-6 en la morfología de la glándula mamaria de ratas ([3341], [3581]). Por este motivo, se caracterizó morfológicamente el estado de diferenciación de la glándula a lo largo del tiempo. El análisis de las distintas **estructuras epiteliales** mostró una evolución similar en todos los grupos experimentales, en concordancia con lo descrito en la bibliografía ([1520], [3122], [5967]). Las estructuras indiferenciadas, TEBs y TDs, fueron las predominantes a los 24 días de edad, y posteriormente, a los 36 días, se observó el inicio de la diferenciación lobular, el cual continuó hasta los 100 días. En edades postpuberales (100 y 246 días) las únicas estructuras indiferenciadas que se observaron fueron los TDs y al mismo tiempo se detectaron algunos lóbulos tipo 3 (estructura más diferenciada en rata no gestante ni lactante). Al finalizar el estudio, a los 246 días de edad, se produjo la regresión del número de estructuras diferenciadas de la glándula y un aumento del número de estructuras indiferenciadas (TDs).

Al comparar el número de las distintas estructuras por efecto de las dietas, los resultados en la glándula mamaria normal (no inducida) mostraron pocas diferencias a los 36 días, mientras que a los 51 días se observó un aumento del número de estructuras diferenciadas, especialmente de lóbulos tipo 2, en los grupos alimentados con dietas hiperlipídicas. Cabe destacar que dichos grupos mantuvieron, a su vez, un número significativamente superior de

estructuras indiferenciadas, concretamente de TDs, en relación al grupo control. Este resultado podría considerarse de relevancia teniendo en cuenta la relación entre dichas estructuras y la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama, tal y como ya se ha comentado anteriormente ([3122], [5967]). Además esta edad (51 días) es de gran importancia ya que se ha descrito como el momento de máxima vulnerabilidad de la glándula mamaria a la transformación neoplásica, coincidiendo con el nivel altamente proliferativo de TEBs y TDs ([443], [6009]). Así, en el momento de la inducción del carcinógeno (53 días), los animales alimentados con dieta hiperlipídica, a pesar de presentar más estructuras diferenciadas, podrían ser más susceptibles al efecto del carcinógeno. Otros autores también han estudiado la influencia de la dieta hiperlipídica n-6 en periodos críticos del desarrollo de la glándula, encontrando una relación entre dicha dieta y el aumento del número de estructuras indiferenciadas (en concreto de los TEBs) y la susceptibilidad a la carcinogénesis ([3341], [3581], [5816]). De todas formas, se ha sugerido que es más importante el momento de exposición a dietas hiperlipídicas PUFA n-6 que no la duración a dicha exposición ([6784]).

En edades más avanzadas, las glándulas mamarias de los animales presentaron algunos Lob3, la estructura epitelial más diferenciada. Aún así, se observaron pocas diferencias significativas entre los grupos. Al final del estudio, los grupos de dieta hiperlipídica presentaron el menor número de estructuras lobulares, siendo M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> los que mostraron los valores más bajos. Por otro lado, el grupo control fue el que presentó mayor número de uno de los tipos de estructuras indiferenciadas, los TDs. En definitiva, el análisis de los resultados al final del estudio tampoco reflejó, al menos con claridad, un efecto diferencial de las dos dietas hiperlipídicas sobre el estado de diferenciación de la glándula mamaria. La administración crónica de las dietas hiperlipídicas, por un lado, y el propio proceso carcinogénico, por otro, podrían haber influenciado en el resultado obtenido. Existen muy pocos estudios publicados que hayan estudiado el efecto de una dieta n-6 sobre la morfología de la glándula mamaria, tal y como se acaba de comentar ([3341], [3581], [5816]). Hasta el momento no se han encontrado otros trabajos en la literatura en los que se estudie el efecto de una dieta de aceite de oliva en el desarrollo de dicha glándula.

Por otro lado, se estudió el **grado de densidad glandular mamaria** dado el interés que ésta presenta en humanos, donde la densidad mamográfica se traduce como el aumento de la glándula, principalmente asociado a células epiteliales y estroma. Existen evidencias que dicha densidad es un factor de riesgo de cáncer de mama, independiente de la edad y otros factores, dado que es el reflejo de que se ha producido proliferación celular ([6857]).

Para el análisis de la densidad de las glándulas de los animales, se desarrolló una escala cualitativa de 4 categorías. Dicho análisis no mostró diferencias entre grupos hasta los 100 días de edad, donde las glándulas de los animales alimentados con dietas hiperlipídicas mostraron una mayor densidad que las del grupo control. Al final del estudio, las glándulas que presentaron niveles de menor densidad fueron las de los animales alimentados con dieta mO20. En cambio, las glándulas de los animales alimentados con dieta M20 fueron las de mayor densidad estructural. Este resultado no se halla en concordancia con el análisis del número de estructuras epiteliales, posiblemente debido al hecho de que la periferia de la glándula, donde se cuantificaron los diferentes tipos de estructuras, sería más representativa de las indiferenciadas, ya que la elongación ductal parece estar dirigida por el TEB proliferativo en el extremo distal de los ductos en crecimiento ([3122]), mientras que la densidad de la glándula mamaria reflejaría el desarrollo en tamaño y estructuras, principalmente lobulares.

En humanos, los datos acerca de la influencia de los ácidos grasos polinsaturados de la dieta sobre la densidad mamaria son controvertidos. Mientras algunos autores han encontrado una asociación positiva entre ésta y la ingesta de elevadas cantidades de PUFA n-6, otros no han hallado cambios ([6859], [6860], [6861]). En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, no se han encontrado trabajos que estudien los efectos de la ingesta de dietas con elevada cantidad de MUFA n-9, procedente principalmente del aceite de oliva, sobre el desarrollo de la glándula mamaria.

Por otra parte, se planteó analizar la diferenciación de la glándula mamaria desde un enfoque a nivel molecular determinando la expresión de  $\beta$ -Caseína, considerada un **marcador de la diferenciación de la glándula mamaria** ([3798], [5101], [5784]). Los niveles de  $\beta$ -Caseína aumentaron en función de la edad en la glándula mamaria de todos los grupos experimentales. Asimismo, el grupo M<sub>IP</sub> presentó una mayor expresión respecto al resto de grupos en edades postpuberales. La falta de significación en algunas edades o condiciones experimentales, podría ser debida a la influencia de otros factores en el resultado. Así, el número de animales utilizados o la heterogeneidad de la fase del ciclo estral en la cual se hallaban los animales en el momento del sacrificio podrían ser algunos de estos factores, ya que ha sido descrita una mayor expresión de  $\beta$ -Caseína en metaestro, mientras que en diestro se expresarían los niveles más bajos ([4033]).

Diversos autores también han hallado un aumento de los niveles de expresión de  $\beta$ -Caseína por efecto de una dieta hiperlipídica de maíz en glándula mamaria de ratas lactantes que habían sido inducidas con carcinógeno ([3454], [4033]). Por otro lado, se ha descrito una

mayor expresión en glándula respecto a los tumores mamarios ([5101]). En este sentido, estudios previos del grupo investigador utilizando dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de aceite de oliva virgen extra, mostraron que  $\beta$ -Caseína no es un buen marcador del grado de diferenciación en tumores mamarios inducidos experimentalmente con DMBA ([5965]).

Los resultados obtenidos en este estudio de  $\beta$ -Caseína no reflejaron los datos obtenidos en el recuento de estructuras en la periferia de la glándula mamaria, pero sí podrían estar en relación con la densidad glandular. Así, se halló una correlación positiva entre la expresión de  $\beta$ -Caseína y la densidad mamaria, de forma estadísticamente significativa fundamentalmente en el grupo  $M_{IP}$  en todas las edades, a excepción de los 51 días. Asimismo, en el grupo control también se hallaron correlaciones positivas a los 36 días de edad y al final del estudio, aunque en éste último caso de forma cercana a la significación. Estos resultados sugieren que los niveles de  $\beta$ -Caseína reflejarían el grado de desarrollo en cuanto a densidad glandular.

Finalmente, es ampliamente conocida la importancia de la interacción entre los diferentes tipos de tejidos y el desarrollo normal y patológico de la glándula mamaria. Debido a la arquitectura histológica del tejido mamario, el adipocito es uno de los tipos celulares estromales predominantes en la glándula, produciéndose en consecuencia, una importante interacción entre el tejido epitelial y el adiposo ([6596]). Así, se ha sugerido que las **adipoquinas** producidas por este tipo celular influenciarían en el desarrollo de la glándula mamaria ([7541]). Por este motivo, se analizó el ARNm de una serie de adipoquinas (Adiponectina y Leptina), el receptor de Leptina (ObR) y el Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo gamma ( $PPAR\gamma$ ). Todos ellos se expresan preferentemente en el tejido adiposo ([7542], [7543]) y parecen estar involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, proliferación celular y, en el caso del  $PPAR\gamma$ , también en la diferenciación de los adipocitos ([5797], [7544], [7545], [7546]). Por otro lado, dichos genes han sido relacionados con otros procesos celulares implicados en carcinogénesis ([6597], [7546], [7551]). Los resultados obtenidos del estudio de la implicación de estos genes en la fisiopatología de los tumores experimentales serán discutidos posteriormente en el apartado de carcinogénesis (apartado B de este capítulo).

En general, los resultados no revelaron diferencias significativas en el análisis de la expresión de Leptina y su receptor ObR a lo largo del estudio. En cambio, la Adiponectina y el  $PPAR\gamma$  mostraron una expresión inferior en los grupos de dieta hiperlipídica respecto al grupo control al final del ensayo. En la literatura no se han hallado datos experimentales sobre la expresión de dichos genes en glándula mamaria, en cambio sí hay numerosos trabajos donde se

estudian los niveles en plasma de las adipoquinas, así como la expresión de ARNm en el tejido adiposo de Adiponectina, Leptina y su receptor, y PPAR $\gamma$ . Se ha descrito una disminución de dicha expresión en tejido adiposo de ratas alimentadas con dieta hiperlipídica durante un periodo corto de tiempo, mientras que a largo plazo se produciría el efecto contrario aumentando dicha expresión ([6660], [7547]). En referencia a los resultados obtenidos en este estudio de la expresión de Adiponectina, parecen estar en concordancia con otros trabajos que describen una menor expresión en tejido adiposo en ratas alimentadas con la denominada dieta de cafetería (rica en grasas y azúcares) a largo plazo ([7548]). Por otro lado, en individuos con un exceso de grasa corporal los niveles plasmáticos de la Leptina se hallan elevados, mientras que los de Adiponectina disminuidos ([7546]). Se ha descrito también un posible efecto antagónico de las dos adipoquinas en la proliferación celular, entre otras funciones. Mientras la Leptina ejercería un efecto promotor, la Adiponectina actuaría como molécula antiproliferativa ([4865], [6591], [7541]). Debido a la contraposición de las funciones de ambas adipoquinas, hay autores que dan más relevancia a la relación entre ellas que a las concentraciones y expresiones absolutas de cada una de ellas ([7549]). En este sentido, se analizó la relación entre la Leptina/Adiponectina, hallándose en edades alrededor de la pubertad un aumento significativo en los grupos de dieta hiperlipídica, especialmente del grupo de aceite de maíz M<sub>IP</sub>. Estos resultados compatibles con una glándula más proliferativa, podrían estar reflejando los distintos momentos del desarrollo de la glándula mamaria, en concordancia con los datos obtenidos en relación al avance de la pubertad en dicho grupo M<sub>IP</sub>. Al final del estudio, los resultados de la relación entre ambas adipoquinas revelaron un aumento significativo en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica independientemente del tipo, hecho que podría reflejar un aumento de proliferación celular por efecto de estas dietas.

## **B. CARCINOGENESIS.**

### **1. PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS.**

El tipo de patología que desarrollaron los animales del estudio fueron afecciones mamarias y en su mayoría tumores malignos, en concreto adenocarcinomas. Este resultado estuvo de acuerdo con lo esperado en este modelo experimental ([1438]). Las patologías benignas más frecuentes fueron los fibroadenomas, seguido de los adenomas y fibromas. También se encontraron carcinomas escamosos, como patología neoplásica no mamaria maligna, en los distintos grupos experimentales, los cuales no perturbaron de forma significativa la salud de los animales afectados.

El resultado del estudio histopatológico de los adenocarcinomas mamarios de rata corroboró las similitudes que éstos presentan con los tumores humanos, tal y como había sido descrito previamente ([4206], [4264]). Aunque no se encontraron representados todos los tipos histológicos, el más frecuente fue el adenocarcinoma de patrón mixto cribiforme/papilar, que mostró variaciones en el grado arquitectural, nuclear y otros parámetros, al igual que en el carcinoma ductal infiltrante de mama humano. La categorización de los parámetros histopatológicos analizados se realizó en base a los criterios descritos en estudios propios realizados previamente ([4264]).

El estudio histopatológico, asimismo, reveló una clara tendencia en los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra a desarrollar tumores de bajo grado arquitectural y nuclear (I y II), de forma similar al grupo control. En cambio, en los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> los tumores fueron mayoritariamente de grados II y III. Además, se observó una mayor actividad mitótica en dichos tumores, especialmente los del grupo M<sub>P</sub>, respecto a los grupos control, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub>, los cuales presentaron niveles similares. Al aplicar el método de clasificación histopatológica adaptado a la rata ([4264]), se observó un mayor porcentaje de tumores de alto grado en el grupo M<sub>IP</sub> y, sobretodo, en M<sub>P</sub>, mientras que los de los grupos de aceite de oliva fueron similares al control. En cuanto a la reacción estromal o desmoplasia, los adenocarcinomas de los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub> fueron los que presentaron una reacción superior al resto de grupos, aunque de forma significativa únicamente en M<sub>P</sub> respecto a O<sub>P</sub>, mientras que los tumores de los grupos alimentados con dieta mO20 presentaron una reactividad parecida al grupo control. Asimismo, se observó una necrosis tumoral significativamente mayor en los adenocarcinomas del grupo M<sub>P</sub>.

Estos datos indican que los adenocarcinomas mamarios de los grupos alimentados con dieta M20, sobre todo los del grupo M<sub>P</sub>, mostraron características morfológicas de mayor agresividad. En cuanto a los tumores de los grupos alimentados con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, independientemente del período de administración, presentaron características de menor grado de malignidad, más parecidos a los tumores del grupo control. Estos resultados confirman y extienden los obtenidos por el grupo en series anteriores ([4264]) que indican que las dietas ricas en lípidos modifican no sólo el comportamiento clínico de los tumores sino también sus características histopatológicas, y que dicho efecto es distinto según el tipo de lípido administrado.

## 2. PARAMETROS CLÍNICOS.

En este trabajo también se analizaron los efectos de la exposición en etapas prepuberal, puberal y/o adulta a dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de aceite de oliva virgen extra sobre las características clínicas de los adenocarcinomas mamarios.

Las tres estrategias utilizadas para analizar el **tiempo de latencia** mostraron resultados concordantes entre sí. Concretamente, los adenocarcinomas aparecieron antes en los grupos alimentados con la dieta M20 (M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>) que en el resto de grupos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La aparición temprana de adenocarcinomas mamarios en estos grupos indicaría una aceleración de la enfermedad cancerosa asociada al consumo de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, lo cual es compatible con el efecto estimulador de dicha dieta que ha sido descrito por el grupo investigador en trabajos previos, así como por otros autores ([1106], [3060], [3615], [4735], [6879]). Este efecto sobre el tiempo de latencia se observó en menor grado en el caso de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra, de manera que los grupos O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> mostraron valores intermedios entre el grupo control y los grupos de dieta rica en aceite de maíz. Este resultado sugiere que la dieta mO20 aceleraría la aparición de los tumores mamarios respecto a la dieta control pero dicho efecto sería más débil que el de la dieta M20. Por otra parte, la falta de significación estadística de las diferencias observadas en el tiempo de latencia podría explicarse por la gran dispersión de los datos y por el número de efectivos, que pudo no haber sido suficiente. En este sentido, debe remarcarse que el diseño experimental del estudio se justifica tanto por la conveniencia de utilizar el menor número de animales posibles para obtener la cantidad necesaria de muestras para los estudios de biología molecular, así como por razones de practicabilidad.

En cuanto a la **incidencia de afectación**, ésta aumentó a lo largo del estudio en todos los grupos experimentales que, en este sentido, mostraron un comportamiento similar. Durante las primeras etapas se observó un rápido aumento del número de animales afectados que tendió a la estabilización en la segunda mitad del ensayo. Los grupos  $M_{IP}$  y  $M_P$  presentaron valores de incidencia significativamente superiores a los del resto de grupos durante todo el estudio. En cambio, los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra mostraron valores más similares al control, especialmente el grupo  $O_{IP}$ , y sin diferencias significativas. No es descartable que el comportamiento de las curvas del parámetro incidencia pueda estar relacionado con los distintos tiempos de latencia de cada uno de los grupos. En el momento del sacrificio, los grupos  $M_{IP}$  y  $M_P$  fueron los de mayor incidencia de afectación, alcanzando el 100% de animales con tumores mamarios malignos, mientras que los grupos  $O_{IP}$  y  $O_P$  mostraron valores de incidencia cercanos a los del grupo C, e incluso inferiores, como en el caso de  $O_{IP}$ . Estos resultados muestran que las dietas ricas en PUFA n-6 aumentan la incidencia de animales afectados de cáncer de mama, efecto que junto al menor tiempo de latencia indicaría la influencia estimuladora de dicha dieta. Por el contrario, la administración de la dieta mO20, rica en MUFA n-9 y numerosos compuestos bioactivos, no modificó significativamente la incidencia de afectación en comparación a la dieta normolipídica.

El **contenido tumoral** se estudió a partir del contenido medio por animal afectado y del número total de tumores por grupo, para poder dar una idea integral del parámetro debido a que cada uno de ellos proporciona una información parcial. En el primer caso, presenta el inconveniente de verse afectado por la dinámica de aparición de tumores en animales no afectados anteriormente, mientras que en el caso del contenido tumoral total, podrían presentar el mismo valor grupos con distinta incidencia. En cuanto a la evolución de ambos parámetros, éstos aumentaron durante todo el estudio en todos los grupos experimentales, especialmente en los grupos de dieta hiperlipídica  $M_{IP}$  y  $M_P$ , mientras que los grupos de aceite de oliva virgen extra mostraron unos valores intermedios entre estos y el grupo control. Asimismo, no se observó una saturación de estos parámetros hacia el final del estudio, lo que sugiere que con la dosis de carcinógeno utilizada y en función de la duración del ensayo, no se alcanzó el máximo de posibilidades en cuanto al contenido tumoral. Tal situación difiere de la obtenida en trabajos anteriores del grupo investigador realizado con 20 mg DMBA/ animal ([1883], [2567]). Respecto a las diferencias debidas a los lípidos de la dieta, los grupos  $M_{IP}$  y  $M_P$  presentaron un comportamiento parecido entre sí, siempre con valores significativamente superiores al resto de grupos a lo largo del estudio, y en el momento del sacrificio respecto al

grupo control. Este mayor contenido tumoral sería nuevamente compatible con el efecto estimulador de las dietas ricas en PUFA n-6. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en el laboratorio y con los observados por otros autores ([3615], [3977], [5321]). En el caso de los grupos de dieta rica en aceite de oliva virgen extra, los contenidos tumoral total y medio evolucionaron de forma similar a los del control durante los 100 a 125 primeros días del estudio. A partir de entonces, los valores fueron superiores en ambos grupos respecto al control, especialmente en  $O_p$ . El grupo  $O_{IP}$  se mantuvo también por encima del control pero más cercano a éste y con la misma velocidad de crecimiento o pendiente. Sin embargo, probablemente debido a las características del test estadístico empleado (test de Friedman), las diferencias a lo largo del estudio sólo resultaron significativas respecto al control en el caso del grupo  $O_{IP}$ . En el momento del sacrificio, en cambio, la situación fue la inversa, con diferencias significativas sólo en el caso del  $O_p$  en el contenido tumoral total.

El **volumen tumoral** se estudió a partir de 3 parámetros: el total por grupo ( $V$ ), el medio por animal del grupo ( $V_A$ ) y el medio por tumor del grupo ( $V_K$ ). Además de proporcionar información diferente, tales parámetros son distintos conceptualmente, por lo tanto, se requiere el estudio de todos ellos para obtener una información completa e integrada. El volumen tumoral por animal sería más apropiado para establecer comparaciones entre los resultados obtenidos de los tumores experimentales y los humanos dado que en los animales existen seis pares de glándulas mamarias a diferencia de la glándula única de los humanos. El volumen por tumor permitiría comparar dentro del propio modelo experimental. Finalmente, el volumen tumoral total no tendría ningún significado práctico ni intuitivo pero complementarían la información proporcionada por los otros dos parámetros. Además, éste último, al no estar influenciado por la incidencia de afectación, no presenta sus problemas.

Como era de esperar a partir del estudio de los parámetros incidencia y contenido tumoral, el volumen de la patología mamaria aumentó, en general, a lo largo del tiempo en los distintos grupos experimentales, especialmente en el grupo  $M_p$ , que destacó por encima de todos los demás. Los grupos de dieta hiperlipídica presentaron valores de  $V$  y  $V_A$  significativamente superiores al control, excepto el grupo  $O_p$  que mostró valores similares a éste en los tres parámetros de volumen tumoral. Las fluctuaciones observadas en el volumen medio por tumor se debieron a la aparición de nuevos tumores de pequeño volumen. Asimismo, el volumen medio por animal se vio afectado por el efecto de la incidencia, tal y como sucedió al analizar el contenido tumoral medio por animal. La ausencia de estabilización de los tres parámetros del volumen tumoral a lo largo del tiempo indicaría que, de la misma forma que en el contenido

tumoral, en las condiciones del ensayo (dosis del carcinógeno y duración) no se alcanzaría el máximo posible de volumen tumoral.

En cuanto al distinto comportamiento de los dos grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz, tal como ya se ha citado, el volumen de los tumores del M<sub>P</sub> fue significativamente superior al de los tumores del M<sub>IP</sub> en los tres parámetros analizados, sugiriendo que los tumores crecieron más lentamente cuando la dieta se administró desde el destete de los animales que cuando se empezó a administrar a partir de la inducción. Estos resultados, junto con los obtenidos en los otros parámetros de la carcinogénesis, sugieren un potente efecto de esta dieta durante la promoción del proceso cancerígeno. Por otro lado, dichos resultados son compatibles con un efecto de la dieta M20 sobre la glándula mamaria que habría afectado también el momento de la iniciación de la carcinogénesis, condicionando una progresión más lenta de las células iniciadas. Cabe destacar que los tumores del grupo M<sub>IP</sub>, a pesar de presentar un menor volumen, mostraron características anatomopatológicas parecidas al grupo M<sub>P</sub>, presentando un mayor grado de malignidad respecto al control y a los grupos de aceite de oliva.

En el caso de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra, O<sub>P</sub> presentó valores similares al control, mientras que O<sub>IP</sub> presentó valores intermedios entre el grupo control y M<sub>P</sub>. Este diferente comportamiento según el momento de la administración del carcinógeno, nuevamente sugieren que las dietas hiperlipídicas podrían ejercer algún efecto sobre la iniciación de la carcinogénesis. Paradójicamente, O<sub>IP</sub> presentó un mayor volumen medio por tumor que M<sub>IP</sub>. No obstante, tal y como se ha destacado anteriormente, a pesar de mostrar un mayor volumen, los tumores del grupo O<sub>IP</sub> presentaron características anatomopatológicas de menor grado de malignidad. En este sentido, una posibilidad es que los tumores del grupo O<sub>IP</sub> no presentasen necrosis, y por lo tanto no habría pérdida de celularidad.

Globalmente, los resultados obtenidos del estudio de las características clínicas e histopatológicas de los adenocarcinomas mamarios indican un claro efecto estimulador, fundamentalmente promotor, de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz. En todos los parámetros analizados se hallaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con dieta M20 y el grupo control. Estas diferencias se manifestaron, por un lado, en el mayor número de animales afectados, y por otro lado, en las características tumorales de mayor grado de malignidad como son la aparición temprana de dichos tumores, el elevado contenido y volumen tumorales y el mayor grado histopatológico. En cuanto al efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra, los resultados no fueron tan claros, observándose una respuesta diferente según la duración de la administración. Así, hasta aproximadamente

los 100 a 125 días, la carcinogénesis evolucionó de forma parecida al grupo control, mientras que para períodos más largos se observó un débil efecto estimulador, tal y como revelaron el tiempo de latencia o el aumento del contenido y volumen tumoral. En cualquier caso, los grupos alimentados con la dieta de aceite de oliva presentaron características similares al grupo control en otros parámetros, tales como la incidencia o el grado anatomopatológico tumoral de menor malignidad que el de los tumores de los grupos de aceite de maíz.

El diferente comportamiento de los grupos experimentales según el inicio de la administración de la dieta podría deberse a varios factores. Así, la administración desde el destete podría influir en el desarrollo de la glándula mamaria, tal y como sugieren los resultados del estudio de la pubertad. Una aceleración en el desarrollo dicha glándula modificaría el grado de su diferenciación en el momento de recibir el insulto carcinogénico, y por tanto, desplazaría la ventana de susceptibilidad o periodo de mayor vulnerabilidad frente a un carcinógeno. Otra posibilidad es que las dietas ejerzan una influencia a nivel hepático, causando una distinta metabolización del carcinógeno. Datos en fase de publicación del equipo investigador han revelado un aumento significativo de las enzimas hepáticas de fase I por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Dichas enzimas son las responsables de la producción de metabolitos que causan daño en el ADN ([6645], [6969]). Estos metabolitos son, posteriormente, inactivados por las enzimas denominadas de fase II. Según los datos obtenidos, la dieta hiperlipídica de aceite de oliva produciría un aumento de las enzimas de fase II, evitando la acumulación de los metabolitos con potencial mutagénico.

Tal como se describió ampliamente en el apartado D de la Introducción, el efecto promotor de las dietas ricas en PUFA n-6 sobre la carcinogénesis mamaria experimental ha sido también descrito por otros laboratorios, ([1358], [3568], [3672], [4324]). En cuanto a las dietas hiperlipídicas de aceite de oliva, sus efectos han sido mucho menos estudiados y existe discrepancia de resultados, habiéndose descrito desde un efecto protector hasta un débilmente promotor y falta de efecto ([3338], [3840], [3861], [4300], [6713]). En una serie experimental anterior, donde se analizó únicamente la situación equivalente a la del grupo O<sub>P</sub> de este trabajo, los resultados sugirieron un papel potencialmente protector del cáncer de mama ([4303], [4736], [5321]). En el presente trabajo se ha obtenido un débil efecto estimulador, aunque sólo tras un cierto tiempo de administración de este tipo de dietas. Además, los tumores fueron de un grado histopatológico de malignidad parecido al de los controles, de la misma forma que en dicha serie anterior. Por otro lado, diversas evidencias apuntan a un efecto estimulador inespecífico de las dietas hiperlipídicas, probablemente

relacionado con el aporte energético a un tejido metabólicamente muy activo como es el tejido tumoral ([1962], [4007]). En este contexto y considerando tanto los resultados previos como la situación de bajo grado tumoral, clínico e histológico, conferida por la dieta de aceite de oliva en este trabajo, los resultados permiten hipotetizar el posible efecto beneficioso que podría tener el aceite de oliva virgen en cantidades moderadas. En este sentido, entre los escasos trabajos experimentales sobre aceite de oliva y cáncer, también se ha señalado que el efecto protector del aceite de oliva se conseguiría administrándolo en cantidades moderadas. Así, la administración perinatal de dietas con un porcentaje moderado de aceite de oliva (7%) tuvo un efecto protector sobre la carcinogénesis mamaria experimental, mientras que la ingesta de mayores cantidades (15%) tuvo desde una ausencia de efecto hasta un efecto débilmente promotor ([5127]). Los resultados de los trabajos realizados por el equipo investigador sobre la influencia del aceite de oliva virgen extra muestran desde una ausencia de efecto a un efecto protector ([4303], [5321]) o débilmente promotor ([6887], [7711]). Una situación parecida se ha descrito en relación al aceite de pescado, rico en PUFA n-3, de manera que una dieta con bajo contenido en estos lípidos disminuyó el riesgo de cáncer de mama, mientras que una dieta rica en este tipo de grasa aumentó significativamente la incidencia y el contenido tumoral ([5059]). Por lo tanto, debe considerarse la posibilidad que cualquier grasa que esté en exceso, incluso las que han demostrado un efecto beneficioso para la salud, como los PUFA n-3 o el aceite de oliva virgen extra, pueda producir un efecto calórico inespecífico suministrando energía a las células cancerosas ([1962], [4007]). Dicho efecto inespecífico se habría visto reflejado en este trabajo en el comportamiento de algunos de los parámetros clínicos de la carcinogénesis.

La variabilidad de resultados acerca del efecto de las dietas ricas en aceite de oliva sobre el cáncer ([5127]) también podría ser debida a las diferentes variedades de aceite utilizadas, que contienen diferentes cantidades de ácido oleico y de componentes minoritarios ([3852]). En concreto, algunos de estos componentes ( $\alpha$ -tocoferol, compuestos fenólicos, fitoesteroles, flavonoides y el hidrocarburo triterpénico escualeno) podrían desempeñar un papel importante en los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la salud, como por ejemplo la capacidad antioxidante que presentan algunos compuestos minoritarios ([3619], [6080], [6517], [6621]). En cuanto al contenido relativo de ácidos grasos, se ha sugerido que el potencial efecto beneficioso del aceite de oliva no sería debido únicamente a la elevada cantidad de ácido oleico (18:1n-9), sino también a un aporte insuficiente de ácido linoleico (18:2n-6) ([1943]), ya que se necesitaría una cierta cantidad de éste, como precursor de

eicosanoides, para una óptima promoción de la carcinogénesis mamaria ([3205]). Aunque el ácido oleico presenta una menor afinidad por la  $\Delta 6$ -desaturasa (el primer paso de la biosíntesis de eicosanoides) que el ácido linoleico, a concentraciones relativamente altas de ácido oleico, éste es capaz de suprimir la actividad de la enzima, disminuir la síntesis de eicosanoides y, en consecuencia, disminuir significativamente el crecimiento tumoral mamario ([3421]). En el modelo experimental de la carcinogénesis mamaria inducida con NMU, las variedades de aceite de oliva con una menor relación de ácido linoleico/ácido oleico (relación 7/100) se asociaron a un menor número de adenocarcinomas y de mayor grado de benignidad que el resto de variedades ([3852]). En este sentido, en el aceite de oliva utilizado en este trabajo dicha relación fue de 1/10. Además, también debe considerarse el contenido en ácidos grasos saturados, cuyo efecto promotor es bien conocido ([4351]). Finalmente, el posible papel quimiopreventivo del aceite de oliva también sería atribuible a una ratio entre PUFA n-6 y n-3 relativamente baja ([6302]).

A pesar de la dificultad que supone la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales al conocimiento de los mecanismos implicados en el cáncer humano, los resultados de este trabajo destacan la importancia de los hábitos dietéticos en relación al desarrollo del cáncer, especialmente la ingesta de grasas. En este sentido, podría concluirse, que el consumo moderado y regular de aceite de oliva virgen, asociado a una reducción de los otros tipos de grasas en la dieta, podría representar un hábito dietético saludable en relación al cáncer de mama.

### **3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA NEOPLÁSICA.**

Para la caracterización morfológica de la glándula mamaria neoplásica se categorizaron las distintas **estructuras anormales**, benignas y malignas, en base a la clasificación de Russo y Russo ([7554]) y en colaboración con un médico del grupo investigador especialista en anatomía patológica de los tumores experimentales.

El resultado del análisis realizado en las glándulas de los animales a los 100 días de edad constató la aparición con antelación de estructuras proliferativas anómalas en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz, tal y como se vio reflejado en la manifestación clínica de la carcinogénesis, y especialmente en el tiempo de latencia. Concretamente, el grupo M<sub>IP</sub> fue el único que presentó microtumores, mientras que los grupos O<sub>IP</sub> y control fueron los únicos que no mostraron estructuras proliferativas anómalas.

En referencia al final del estudio, se observó un aumento en el número de todas las estructuras proliferativas anómalas en todos los grupos experimentales en comparación a las encontradas los 100 días de edad. Los grupos de dieta M20 fueron los que presentaron mayor número de hiperplasias respecto al resto de grupos, siendo M<sub>IP</sub> el que mostró diferencias significativas. Este aumento de hiperplasias podría estar relacionado con la mayor densidad mamaria hallada en los grupos alimentados con dieta de aceite de maíz al final del estudio. Además, todos los grupos de dieta hiperlipídica presentaron un aumento de proliferaciones intraductolobulillares tipo 1 (PIDL1) y de tipo 2 (PIDL2) respecto al grupo control, a excepción del grupo de aceite de oliva O<sub>IP</sub>, el cual presentó niveles similares. El número de microtumores observados también fue superior en los grupos de dieta hiperlipídica, independientemente del tipo, siendo M<sub>IP</sub> el que presentó mayor número de animales afectados.

El estudio morfológico de la glándula mamaria sugirió un aumento del número de estructuras proliferativas anómalas por efecto de las dietas hiperlipídicas, especialmente la rica en aceite de maíz. Los resultados observados al final del estudio en relación al efecto diferencial de las dos dietas hiperlipídicas, fueron concordantes a los obtenidos en el análisis de los parámetros de la carcinogénesis, aunque no tan concluyentes, probablemente por motivos metodológicos inevitables, tal y como sería la exéresis de los tumores macroscópicos durante la necropsia antes del procesamiento y estudio morfológico de las glándulas. Asimismo, es importante recordar que el análisis fue realizado en la periferia de la glándula debido a la imposibilidad de estudiar la zona central por la densidad mamaria. En definitiva, no fue posible caracterizar el estado neoplásico real de las glándulas mamarias. Aún así, los resultados obtenidos en este estudio estuvieron en concordancia con el comportamiento clínico de los tumores mamarios que sugieren un comportamiento tumoral más agresivo por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz. En la literatura no se han hallado trabajos donde se analicen las microestructuras proliferativas anómalas de la glándula inducida con carcinógeno y el posible efecto de los lípidos de la dieta ejercerían sobre ello.

#### **4. RECEPTORES HORMONALES.**

Tal y como ya se ha comentado anteriormente (subapartado A.3), el estado hormonal, principalmente los niveles de estrógenos y sus receptores, está muy relacionado con el desarrollo del cáncer de mama. Por otra parte, cabe destacar que la determinación del patrón

de expresión de receptores de estrógenos y progesterona de los tumores mamarios tiene una gran importancia como factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento hormonal ([2643]). Dada la gran relevancia de dichos receptores en el cáncer de mama, y considerando el posible efecto de la dieta en el desarrollo de esta enfermedad, en el presente trabajo se ha analizado la expresión de los receptores de estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  y el de progesterona en los tumores mamarios inducidos con el carcinógeno DMBA.

Los resultados obtenidos del estudio de la expresión del ARNm de dichos receptores en adenocarcinomas mamarios no revelaron, en general, diferencias significativas a excepción de un aumento del RE $\alpha$  en el grupo M<sub>IP</sub>, alimentado con dieta M20 desde el destete. Otros estudios en relación a la expresión de estos receptores y el posible efecto que pueden ejercer los lípidos de la dieta han mostrado resultados contradictorios. Por un lado, no se ha hallado ningún cambio en el patrón de expresión de los receptores de estrógenos y progesterona en adenocarcinomas mamarios de rata por efecto de una dieta hiperlipídica de aceite de maíz al 20% de energía ([1046], [5664]). En cambio, un estudio *in vitro* realizado con células T47D postuló que la modulación de la proliferación celular del cáncer de mama por los PUFA n-6 incluiría un aumento de los niveles de expresión del RE $\alpha$  ([4542]). Además, los datos acerca de las acciones de RE $\beta$  en relación a RE $\alpha$ , y la correlación entre RE $\beta$  y el pronóstico y la respuesta a la terapia endocrina son todavía contradictorios ([5265], [6920], [6921]). Aún así, tal y como se comentó anteriormente en la discusión del estado hormonal, se ha descrito una asociación entre el aumento de expresión de RE $\alpha$  y la disminución de RE $\beta$ , con un elevado riesgo de cáncer de mama, debido a las distintas funciones que se ha atribuido a ambos receptores ([5985], [7540]). Así, la isoforma  $\alpha$  estaría relacionada con actividad proliferativa y un elevado grado histológico de los tumores, mientras que la  $\beta$  ejercería un papel inhibidor de la proliferación además de estar relacionado con la diferenciación tumoral ([5099], [5265], [5985], [6963], [6967]).

De la misma manera que en glándula mamaria, en los adenocarcinomas también se analizó la expresión de la proteína del RE $\alpha$  y el RE $\beta$ , así como su ratio y, de igual forma, habría que considerar con precaución los resultados obtenidos por inmunohistoquímica debido a las limitaciones anteriormente comentadas de los tests estadísticos. En cualquier caso, en este tejido sí se pudo analizar los datos de la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ , los cuales revelaron un aumento en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz, especialmente en el M<sub>P</sub>, respecto al grupo control y a los de dieta rica en aceite de oliva virgen extra. El incremento de la ratio RE $\alpha$ /RE $\beta$  en M<sub>P</sub> podría estar relacionado con un

aumento de la tasa de proliferación de los tumores de dicho grupo. Estos resultados podrían estar relacionados con los obtenidos en la caracterización anatomopatológica de los tumores, que indicaron una mayor actividad mitótica, así como un mayor grado de malignidad, en los tumores del grupo Mp. Tal y como se ha obtenido sistemáticamente en las diferentes series experimentales desarrolladas por el equipo investigador ([4264], [4303], [4736], [5321]).

En definitiva, a pesar de la relevancia del estado hormonal en el desarrollo del cáncer de mama, los lípidos de la dieta no parecen alterar significativamente dicho estado ni ejercer sus efectos moduladores de la carcinogénesis mamaria experimental a este nivel. Esto podría estar indicando que un factor ambiental, como la dieta, ejercería efectos más sutiles, y no tendría una influencia tan marcada como para modificar características esenciales del cáncer de mama, como es la hormonodependencia o, según se demostró previamente en el laboratorio, la expresión y actividad de ciertos oncogenes, como c-erbB2/Neu ([6879]). Aún así, se han observado algunas modificaciones en la relación de los receptores de estrógenos que podrían estar relacionadas con el mayor grado de malignidad del grupo alimentado con dieta hiperlipídica n-6 desde la inducción. Por otro lado, los lípidos podrían afectar el estado hormonal a otros niveles, tal y como ya se ha comentado, aumentando la vida reproductiva por el avance del inicio de la pubertad, y así, incrementando el tiempo de exposición a estrógenos. Tampoco se pueden descartar otros mecanismos de acción, tales como la regulación de la actividad de los receptores estrogénicos mediante cambios postraduccionales, como por ejemplo la fosforilación ([6799]).

## **5. HORMONAS Y RECEPTORES RELACIONADOS CON LÍPIDOS Y CÁNCER DE MAMA.**

El tejido adiposo es una importante fuente de expresión de Adiponectina, Leptina y su receptor (ObR), y PPAR $\gamma$  tal y como se ha comentado anteriormente en el subapartado A.4 de este capítulo ([7542], [7543]). Dichos genes están involucrados en varios procesos reguladores del metabolismo lipídico, la proliferación celular y otros mecanismos relacionados con la tumorigénesis mamaria tal y como son la angiogénesis o la apoptosis ([5797], [6597], [7544], [7545], [7546], [7550], [7551]). De esta manera, debido a la estrecha relación entre el tejido adiposo y el tumoral mamario, y al efecto de dichas hormonas y receptores en procesos clave en la transformación maligna, se estudió la expresión de ARNm de estos genes en los tumores experimentales. Al analizar los resultados de la expresión de

Leptina y su receptor, no se hallaron diferencias significativas a excepción de una disminución de los niveles de ARNm de Leptina en el grupo M<sub>p</sub> respecto al control. Asimismo, el estudio de la Adiponectina y el PPAR $\gamma$ , reveló una disminución de los niveles de expresión en los grupos de dieta hiperlipídica.

Por otro lado, numerosas evidencias indican que Leptina y Adiponectina ejercerían funciones contrarias. Así, mientras Leptina estaría implicada en la proliferación celular y en el aumento de la actividad aromatasas, y por lo tanto, aumentaría la estrogenicidad ([4865], [6569], [7550]), la Adiponectina ejercería acciones antagónicas ([6596], [7544]). Asimismo, se ha descrito un efecto proapoptótico y antiangiogénico por parte de Adiponectina, y se la ha relacionado, junto con PPAR $\gamma$ , con la disminución del tamaño tumoral ([6597], [7541], [7551], [7552], [7553]). Por todo ello, se ha considerado más relevante la relación entre ambas adiponectinas que las concentraciones absolutas de ellas tal y como se ha comentado anteriormente en el subapartado A.4 de este capítulo. En este sentido, se ha propuesto dicha ratio como factor pronóstico o estrategia terapéutica del cáncer de mama en la postmenopausia ([7549]). Por lo tanto, se estudió la relación Leptina/Adiponectina, observándose los valores inferiores en el grupo control y O<sub>p</sub>, mientras que M<sub>p</sub>, alimentado con dieta M20, mostró la ratio más elevada. Estos resultados estarían en concordancia con los datos del estudio de anatomía patológica que mostraron un aumento de mitosis, así como con el rápido crecimiento tumoral caracterizado con el parámetro clínico del volumen tumoral de la carcinogénesis. Asimismo, los resultados también se hallan en concordancia con los obtenidos en el estudio de los receptores hormonales, que sugieren un aumento de la proliferación en los tumores de dicho grupo.

## **C. MECANISMOS MOLECULARES DE LA CARCINOGENESIS.**

### **1. ESTRÉS OXIDATIVO COMO MECANISMO DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.**

El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la carcinogénesis. El daño ocasionado por los radicales libres sobre macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN), de forma directa o indirecta a través de metabolitos de la peroxidación lipídica, favorece la transformación neoplásica de una célula sana a una célula tumoral, y progresivamente incrementa los eventos mutagénicos de dicha célula tumoral ([5845]). Otra manera de abordar el efecto de los lípidos de la dieta en la susceptibilidad o resistencia de la glándula mamaria a su transformación neoplásica ha sido investigando si el efecto modulador de los lípidos polinsaturados n-6 y del aceite de oliva de la dieta en el cáncer de mama experimental podría realizarse, al menos en parte, mediante cambios en el nivel de estrés oxidativo celular, a través de alteraciones en los diferentes sistemas antioxidantes y en la peroxidación lipídica, así como el estudio del daño oxidativo sobre lípidos y el ADN.

#### **1.1. Capacidad Antioxidante.**

En primer lugar, se investigó el nivel de expresión y de actividad de las enzimas que se encuentran en primera línea de defensa antioxidante: SOD, GPx y Catalasa. Las tres enzimas son importantes “barrenderos” o *scavenging* de radicales libres, por lo que su desregularización se ha visto implicada en cáncer ([6456]) y, en particular, en cáncer de mama ([6083]). La importancia de dichas enzimas también radica en que éstas pueden ser alteradas por los lípidos de la dieta ([6692]). De las tres isoformas que presenta SOD, se estudiaron la isoforma citosólica (CuZnSOD) y la mitocondrial (MnSOD). Ésta última es además de interés por su localización, ya que se encuentra en el mismo espacio mitocondrial donde tiene lugar la cadena respiratoria ([6438]). Además, existen numerosos estudios que le atribuyen un efecto inhibitor de tumores ([6095], [6490], [6494]). En cuanto a la enzima Glutación peroxidasa (GPx), la isoforma citosólica o cGPx fue seleccionada por ser la más abundante y de expresión ubicua, mientras que la isoforma fosfolípido hidroperóxido GPx o PHGPx lo fue por ser la única enzima peroxidasa que actúa directamente sobre hidroperóxidos de fosfolípidos incorporados en membrana o lipoproteínas, también de expresión ubicua (véase subapartado E.3 de la Introducción).

Los niveles obtenidos de expresión y actividad de las **enzimas antioxidantes** (CuZnSOD, MNSOD, cGPx, PHGPx y Catalasa) en **glándula mamaria** presentaron una evolución parecida a lo largo del tiempo, observándose diferencias en el comportamiento del tejido sano y el inducido. Así, los grupos alimentados con dieta hiperlipídica mostraron niveles inferiores en la expresión y, principalmente, en la actividad de las enzimas CuZnSOD y SOD total a los 36 días de edad de los animales, sugiriendo que la capacidad antioxidante estaría disminuida. Este efecto parece desaparecer a los 51 días de edad en donde todos los grupos presentaron niveles prácticamente iguales, sugiriendo una adaptación del sistema a una dieta crónica en el tejido sano. Posteriormente, en edades en las que la glándula mamaria ya estaba inducida (100 y 246 días), se observó un efecto de la dieta más variable, sobre todo al final del estudio. En cuanto a las enzimas Glutación peroxidasa, éstas no presentaron claras diferencias entre los distintos grupos a lo largo del tiempo. Aún así, en general, se produjo una disminución de la PHGPx en los grupos de dieta hiperlipídica, aunque no se observó una clara tendencia al comparar la expresión y la actividad de dicha enzima. Por otro lado, el análisis de la enzima Catalasa mostró una disminución de los niveles de expresión a los 51 días en los grupos de dieta hiperlipídica, y en general de su actividad, especialmente en edades prepuberales en la glándula mamaria no inducida. Por otro lado, al comparar los perfiles de expresión y actividad de las distintas enzimas, los resultados mostraron que la principal en la glándula mamaria es Catalasa. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por otros autores ([6063], [6134], [6137], [6148]).

La ausencia de cambios en el sistema antioxidante enzimático por efecto de las dietas hiperlipídicas al final del ensayo, podría deberse a la administración crónica de las dietas. Diversos estudios realizados en humanos han mostrado cambios en las enzimas antioxidantes en la etapa post-pandrial ([6754], [6891]). En este trabajo, las dietas podrían haber tenido un efecto agudo, observado en los primeros días de la administración de las dietas hiperlipídicas, en el que la capacidad antioxidante de la glándula mamaria estaría disminuida, seguido de una adaptación por parte del organismo a la ingesta crónica de dichas dietas. Aún así, no se puede descartar que dicho efecto pudiera haber influenciado en la carcinogénesis, dado el distinto rendimiento observado entre los grupos de dieta hiperlipídica y el control.

Es bien conocido que los lípidos de la dieta pueden modificar el estado redox de tejidos sanos. Mataix y colaboradores estudiaron los efectos de los ácidos grasos procedentes de aceites de la dieta en diferentes tejidos ([4633], [6755]). Entre los distintos ácidos grasos estudiados, los PUFA n-3 fueron los de mayor efecto antioxidante debido, en parte, a la estimulación de la

actividad enzimática de SOD, GPx y Catalasa ([6692]). En relación al aceite de oliva virgen, se ha descrito que posee gran capacidad antioxidante debido a sus componentes minoritarios. En este sentido, aceites de semillas enriquecidos con ácido oleico presentan los mismos efectos que un aceite de oliva refinado ([4631], [6611], [6692]). Por otro lado, la ingesta de aceite de maíz supone un aumento del estrés oxidativo que podría afectar a las enzimas antioxidantes disminuyendo su nivel de actividad ([6753]). En este trabajo se ha observado una disminución de la actividad enzimática tras un corto periodo de ingesta de dieta rica en aceite de maíz y en aceite de oliva virgen extra. Las distintas variedades de aceite de oliva empleados en otros trabajos de la literatura podrían explicar los distintos resultados obtenidos con la dieta mO20. Por otro lado, el perfil de expresión y actividad de las enzimas a lo largo del tiempo sugiere un efecto de la edad. Así, por ejemplo, los perfiles de actividad de SOD y Catalasa sugieren una disminución desde la pubertad (36 días) hasta la madurez del animal (100 días). En este sentido, la disminución observada por efecto de las dietas hiperlipídicas a estas edades podría también estar reflejando los distintos momentos de la maduración de la glándula mamaria, tal y como sugieren los resultados del estudio de la pubertad.

En cuanto a los datos obtenidos de la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes en los **adenocarcinomas mamarios**, únicamente se observó una disminución de la expresión de cGPx por efecto de las dietas hiperlipídicas respecto al grupo control, que fue significativo en los grupos de aceite de oliva. Asimismo, el estudio de la actividad enzimática no presentó diferencias significativas de los grupos de dietas hiperlipídicas respecto al control. Por otro lado, se hallaron algunas diferencias entre dichas dietas hiperlipídicas. Los grupos alimentados con dieta rica en aceite de maíz mostraron, por un lado una menor actividad de la enzima SOD total, así como un aumento de la GPx en el caso de M<sub>P</sub>, mientras que M<sub>IP</sub> presentó un aumento de la actividad de Catalasa.

En el patrón de expresión de las enzimas antioxidantes en los adenocarcinomas mamarios del grupo control destacó la isoforma cGPx, seguida de Catalasa y CuZnSOD. En cambio, en los grupos de dieta hiperlipídica los niveles de expresión de cGPx fueron inferiores a los del grupo control y más similares a Catalasa. Las enzimas MnSOD y PHGPx presentaron los niveles más bajos en todos los grupos experimentales. Según la información disponible, no se ha descrito un perfil de expresión de enzimas antioxidantes común a todos los tumores mamarios.

Al comparar los resultados obtenidos en glándula mamaria y tumor, se observó una clara disminución de la capacidad antioxidante en los adenocarcinomas mamarios, que se manifestó en niveles de expresión y de actividad de las enzimas antioxidantes inferiores a los de la

glándula mamaria al final del estudio. Así, los tumores mamaros analizados mostraron una disminución de la expresión de MnSOD, PHGPx, cGPx y Catalasa. En cGPx, la disminución de los niveles de expresión fue más importante en los grupos de dieta hiperlipídica, independientemente del tipo. En cuanto a la actividad de las distintas enzimas en ambos tejidos, se observó una disminución importante de Catalasa en los adenocarcinomas mamaros.

Numerosos trabajos han descrito diferencias en el nivel de estrés oxidativo en glándula mamaria, hígado y otros tejidos de ratas inducidas con DMBA al compararlos con ratas sanas ([6063], [6072], [6134], [6148], [6714]). Este mismo efecto también se ha observado en estudios realizados en humanos ([5421], [6529], [6577], [6720]). La disminución de la capacidad antioxidante, además, se ha observado en animales o pacientes con cáncer distinto al de mama, respecto a un grupo control sano ([5846], [6067]). Otros autores, en cambio, describen un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes en pacientes con cáncer de mama ([6743]). Se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en diferentes tipos de cáncer, incluido el de mama, como consecuencia de un mayor metabolismo y de una disminución de la capacidad antioxidante, respecto al tejido normal ([5846], [6067]). Asimismo, en la literatura hay controversia en cuanto al papel de las enzimas antioxidantes en la carcinogénesis mamaria. Algunos autores relacionaron la disminución de los niveles de actividad de SOD, GPx y Catalasa con el crecimiento tumoral ([6192], [6488]), mientras que otros han descrito un aumento de la capacidad antioxidante de la célula cancerosa en respuesta al estrés oxidativo, en comparación con el tejido glandular sano y con enfermedades mamaras benignas ([5421], [6494], [6750]). En éste y otros tipos de cáncer, este perfil antioxidante favorecería la proliferación celular, dando lugar a tumores más agresivos ([6484], [6493], [6495]), además de evitar la apoptosis ([6062], [6145]). En cualquier caso, independientemente de si los niveles de actividad enzimática son modificados o no, si no son suficientes para eliminar de forma eficaz los radicales libres generados durante el proceso carcinogénico, aumentará el estrés oxidativo de la célula tumoral y, como consecuencia, el daño en macromoléculas celulares ([5846], [6067], [6715]). Este mayor nivel de daño puede llevar a la célula a la apoptosis o, por el contrario, conferirle un fenotipo más agresivo ([6786]).

En definitiva, el cáncer de mama experimental se asocia a una disminución de la capacidad antioxidante enzimática respecto al tejido normal. Esta pérdida de capacidad antioxidante podría ser mayor por efecto de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de aceite de oliva virgen.

Tras valorar el estado de las enzimas antioxidantes en glándula y adenocarcinomas mamarios, se analizó el **sistema antioxidante no enzimático** más importante de la célula: el Glutación, principal regulador de la homeostasis redox intracelular, el cual actúa como cofactor por diferentes enzimas antioxidantes y, además, puede actuar directamente sobre radicales libres, hidroperóxidos o proteínas oxidadas, uniéndose a éstos a través de puentes disulfuro. En este sentido, es considerado un marcador o indicador del nivel de estrés oxidativo. Se determinaron los niveles de su forma oxidada, GSSG, y reducida, GSH, así como la relación entre ambas.

En humanos, bajas concentraciones de GSH pueden estar asociadas con la edad y la patogénesis de diversas enfermedades, como el desarrollo del cáncer. Tal y como se ha comentado anteriormente, existen resultados controvertidos respecto a los cambios que se pueden producir en la capacidad antioxidante en cáncer. Así, existen trabajos que muestran desde una disminución de los niveles de glutación en pacientes con cáncer de mama respecto a pacientes sanas ([6720]), hasta un aumento inducido por el mayor estrés oxidativo ocasionado por la enfermedad cancerosa ([6715]). Tanto en humanos como en modelos experimentales, el resultado más frecuente es la disminución de los niveles de GSH y el aumento de la ratio GSSG/GSH como reflejo del estrés oxidativo en pacientes con cáncer o animales inducidos con carcinógeno ([6063], [6712], [6720], [6728], [6756]).

Los niveles de Glutación obtenidos en **glándula mamaria** mostraron una evolución muy heterogénea a lo largo del tiempo y en todos los grupos experimentales. En las edades previas a la inducción (36 días) se observó un aumento no significativo en los grupos de dieta hiperlipídica en los niveles de GSSG y GSH. De la misma manera, la ratio de ambas formas del Glutación aumentó, principalmente en el grupo M<sub>IP</sub>, lo cual podría ser un reflejo del aumento del estrés oxidativo por efecto de las dietas hiperlipídicas, sobretudo en dicho grupo. En este sentido, los resultados observados estarían en concordancia con la disminución de la capacidad enzimática antioxidante de estos grupos y a esta edad.

Por otro lado, a los 51 días de edad no se hallaron diferencias significativas, y a los 100 días, con la glándula mamaria inducida, los niveles de Glutación fueron muy variables entre los grupos experimentales y tampoco se hallaron diferencias significativas en la ratio GSSG/GSH. En cambio, al final del estudio los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz presentaron un aumento de los niveles de ambas formas del Glutación. Además, la ratio fue más elevada en el grupo M<sub>IP</sub>. El aumento del estrés oxidativo en los grupos de dieta rica en aceite de maíz, podría ser debido tanto a la elevada ingesta de lípidos

como al hecho de que los PUFA n-6 son más susceptibles a sufrir oxidación y convertirse en radicales libres ([6422]). Asimismo, otros autores han descrito situaciones similares relacionando el aumento de GSH con una mayor proliferación del tejido, y el aumento de la ratio con un mayor estrés oxidativo ([6756], [6761]).

En cuanto a la dieta mO20, los resultados en glándula mamaria fueron diferentes según si esta dieta se administró antes de la inducción con DMBA o después. Así, el grupo O<sub>IP</sub> mostró una disminución significativa de los niveles de GSSG y GSH, además de una ratio similar al grupo control en edades post-inducción del carcinógeno. En cambio, dicha relación en el grupo O<sub>P</sub> fue significativamente superior, con niveles de ambas formas del Glutación también elevados al final del estudio. Esto sugeriría que la ingesta de este tipo de dieta desde edades tempranas podría haber modificado la glándula mamaria condicionando su comportamiento en etapas posteriores. En base a los resultados de la ratio, el grupo O<sub>IP</sub> presentaría una mejor respuesta a la exposición crónica a una dieta hiperlipídica en comparación al grupo O<sub>P</sub>. Sin embargo, en O<sub>P</sub>, junto a una ratio aumentada, se produjo una inducción significativa de los niveles de GSH, que podría sugerir una respuesta por parte del tejido frente a este estrés oxidativo. Por otra parte, se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo*, el efecto de la disminución de los niveles de GSH sobre la inducción de la apoptosis ([6075], [6759]). Así, los bajos niveles de Glutación obtenidos en la glándula mamaria del grupo O<sub>IP</sub> podrían estar estimulando vías de muerte celular, lo que favorecería la eliminación de las células transformadas, o simplemente producirían una parada del ciclo celular evitando así la proliferación. Este hecho estaría en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio morfológico de la glándula mamaria, donde el grupo O<sub>IP</sub> fue el que presentó el menor número de hiperplasias y proliferaciones intra-ductolobulillares tipo 1.

En relación a los **adenocarcinomas mamarios**, en general los niveles de GSSG y GSH aumentaron en todos los grupos de dieta hiperlipídica, y de forma significativa, en el caso de GSH. En cuanto a la ratio GSSG/GSH, ésta no mostró diferencias entre grupos, sugiriendo un estado de estrés oxidativo similar en todas las condiciones experimentales. Por otro lado, es bien sabido que este tejido está formado por células que han escapado del control fisiológico del tejido original, con un patrón de expresión alterado, con un crecimiento, aparentemente, descontrolado y con un elevado gasto energético. Debido a esta última característica, cabría pensar que la tendencia a aumentar los niveles de Glutación en tumor por efecto de una dieta hiperlipídica, independientemente del tipo, podría estar sugiriendo, por un lado, un mayor estrés oxidativo a causa de la ingesta de grandes cantidades de ácidos grasos,

puesto que representarían una importante fuente de energía de la célula tumoral, y, por otro, una mayor capacidad proliferativa de la célula de estos tumores respecto a la del grupo control ([6756], [6761]). Sin embargo, en este estudio los resultados de la ratio no indican un aumento del estrés oxidativo por efecto de las dietas, sugiriendo una respuesta por parte del tejido, tal y como se ha sugerido en la literatura ([7708]).

Asociada a la pérdida de la capacidad antioxidante por la disminución de las enzimas antioxidantes en los adenocarcinomas mamarios respecto al tejido normal, en este trabajo se ha observado una reducción general de los niveles de Glutación en el tejido tumoral. Esta misma situación ha sido descrita en la literatura en el desarrollo del cáncer ([5845], [6717], [6718]). Por el contrario, otros autores afirman que un medio intracelular reducido favorece la proliferación y reduce la apoptosis de células tumorales ([5879], [6759], [6760], [6764]). En el caso del grupo O<sub>IP</sub>, los niveles de GSSG y GSH fueron significativamente superiores en los tumores mamarios respecto a la glándula mamaria, como consecuencia de la disminución del Glutación en este último tejido, y no por un aumento de dicho parámetro en el tumor, puesto que sus niveles no destacaron en comparación a los tumores mamarios del resto de grupos experimentales.

Por otra parte, se analizó una de las enzimas reguladoras del Glutación de la célula, la Glutación reductasa (GSR). Esta es una de las enzimas que podrían estar implicadas en el mantenimiento de niveles de Glutación suficientes para alcanzar un estado redox óptimo para la célula de la glándula mamaria ([6138]). Los niveles obtenidos de ARNm en glándula mamaria mostraron una evolución similar a las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y Catalasa) a lo largo del tiempo, observándose una menor expresión de GSR en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica a los 36 días, aunque no de forma significativa, sugiriendo de nuevo, que la capacidad antioxidante estaría disminuida debido a la acumulación de la forma oxidada del Glutación (GSSG). En cambio, a los 51 días parece que el sistema alcanzó un cierto equilibrio, ya que los niveles de GSR fueron prácticamente iguales en todos los grupos experimentales, mientras que, posteriormente, en glándula mamaria inducida (100 días y final del estudio) los grupos alimentados con dieta mO20 fueron los que presentaron, aunque no de forma significativa, los niveles más bajos. El análisis de esta enzima en los adenocarcinomas mamarios reveló pocas diferencias significativas, únicamente mostró una disminución de la expresión en el grupo O<sub>IP</sub> respecto al control y al grupo M<sub>P</sub>.

En conjunto, los lípidos de la dieta ejercieron sus efectos sobre la capacidad antioxidante de la célula tumoral y la glándula mamaria, según el tipo de ácido graso y el período de exposición. No se puede descartar el hecho de que los lípidos de la dieta puedan

tener efectos a otros niveles, por ejemplo, sobre las demás enzimas del sistema Glutación no analizadas en este trabajo (Glutación-S-transferasa y la enzima  $\gamma$ -Glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS), que sintetiza GSH *de novo*) o sobre enzimas de detoxificación de fase II, directamente relacionadas con el estado redox de la célula. Además, tampoco puede descartarse que el aumento de los niveles de Glutación y de la ratio GSSG/GSH represente un mecanismo de adaptación contra  $H_2O_2$  y otros peróxidos formados en el tejido tumoral. Sin embargo, al igual que lo descrito en otros estudios ([5845]), dicho aumento no fue suficiente para prevenir el estrés oxidativo en las células tumorales.

## 1.2. Daño Oxidativo.

### *Peroxidación Lipídica*

Debido a la diferente susceptibilidad de los PUFA y los MUFA a ser oxidados, se determinó el nivel de  $F_2$ -IsoP en plasma como marcador de peroxidación lipídica.  $F_2$ -IsoP es un tipo de isoprostanos que se generan a partir de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico inducida por radicales libres y que, posteriormente, son liberados a sangre ([6520]). Los resultados obtenidos en plasma mostraron un distinto comportamiento según la edad analizada. A los 36 días los grupos de dieta hiperlipídica presentaron un mayor nivel de  $F_2$ -IsoP, mientras que a 51 días todos los grupos presentaron unos niveles similares, y a los 100 días volvieron a aumentar respecto al control. Por otro lado, al final del estudio, la situación fue a la inversa, los niveles de  $F_2$ -IsoP fueron inferiores en los grupos de dieta hiperlipídica respecto al control.

Este estudio de los isoprostanos  $F_2$ -IsoP no mostró un efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas, aunque se halló el aumento no significativo de sus niveles en el grupo  $M_{IP}$  respecto a  $O_{IP}$  a los 36 y 51 días. Por tanto, en los grupos  $M_{IP}$  y  $M_P$ , los niveles de peroxidación lipídica no fueron mayores que en  $O_{IP}$  y  $O_P$ , a pesar de que la capacidad de los ácidos grasos a ser oxidados está directamente relacionada con el número de dobles enlaces que presentan ([6422]). Sea como fuere, los resultados obtenidos de  $F_2$ -IsoP no parecen reflejar los niveles de peroxidación lipídica. De hecho, al contrario de lo esperado a los 246 días, los niveles de isoprostanos que presentaron los grupos de dieta hiperlipídica fueron inferiores respecto al grupo control. Existen numerosos trabajos que han estudiado la peroxidación lipídica como posible mecanismo de acción de los lípidos de la dieta en la carcinogénesis ([6193], [6197], [6772]). Asimismo se ha descrito un distinto efecto para cada tipo de ácido graso. Los PUFA n-

6 podrían ejercer su efecto promotor sobre la carcinogénesis a través de su oxidación y el consecuente aumento de los niveles de peroxidación lipídica causando daños en el ADN ([4808], [6193]). En cuanto a los MUFA n-9, éstos serían menos susceptibles a ser oxidados y mucho menos a iniciar cadenas de peroxidación lipídica ([6421]). Los escasos trabajos que analizan los efectos de los MUFA n-9 sobre la carcinogénesis mamaria en relación con los niveles de peroxidación lipídica, no han observado cambios o incluso sugieren un efecto protector de los componentes minoritarios del aceite de oliva a través de su capacidad antioxidante ([3621], [3854], [4399], [4403], [4404], [4808]).

Un análisis complementario de la peroxidación lipídica fue el de los niveles de lipofuscina en hígado. El pigmento lipofuscina está formado por componentes oxidados, principalmente productos de la peroxidación lipídica (véase subapartado E.3 de la Introducción). Representa el punto final de dicha peroxidación y, además, es fácilmente detectable, de modo que se considera un biomarcador celular del estrés oxidativo ([6552]). Los resultados obtenidos mostraron un aumento de los niveles de lipofuscina en hígado por efecto de la dieta rica en PUFA n-6, respecto al resto de grupos experimentales. Además, el grupo M<sub>IP</sub>, alimentado con dicha dieta desde el destete, presentó el mayor número de animales con acumulo de lipofuscina y los mayores niveles de ésta. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, independientemente del inicio de su administración, no mostró cambios respecto al control. Este dato iría a favor del efecto estimulador del aceite de maíz sobre la peroxidación lipídica.

### ***Daño Genómico***

La disminución de la capacidad antioxidante provocada por el cáncer suele ir acompañada de un aumento de los niveles de daño genómico inducido por estrés oxidativo ([6712], [6781], [6783]). Entre las lesiones que puede sufrir la cadena de ADN se encuentran roturas de doble cadena y modificaciones de bases como la 8-oxo-dG (véase subapartado E.3 de la Introducción). Aunque la primera no es específica del estrés oxidativo, la segunda es la lesión pre-mutagénica más frecuente en condiciones de elevado estrés oxidativo ([6074]). Por esta razón se decidió estudiar los niveles de 8-oxo-dG, así como las roturas de sencilla y doble cadena en el ADN nuclear. Éstas últimas se analizaron mediante el ensayo Comet, el cual se utiliza con frecuencia para determinar el efecto de ROS en el ADN así como los efectos protectores de ciertos antioxidantes de la dieta ([6775]).

En cuanto al estudio de los niveles de 8-oxo-dG en **glándula mamaria**, las dietas hiperlipídicas presentaron niveles inferiores al grupo control a los 36 días, mientras que

posteriormente (51 días) se igualaron. A los 100 días, en que la glándula mamaria estaba inducida, los grupos alimentados con dieta hiperlipídica, independientemente del tipo, presentaron unos niveles superiores respecto al control, mientras que al final del estudio, únicamente los grupos de aceite de oliva fueron los que presentaron un aumento de los niveles de 8-oxo-dG. Por otro lado, el ensayo Comet realizado en glándula mamaria no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales a excepción de una disminución en el grupo O<sub>IP</sub> al final del estudio. Según los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad antioxidante, el conjunto de estos datos sería contradictorio ya que debido a la administración de dietas con elevado contenido en lípidos, cabría esperar un aumento del daño oxidativo en el ADN respecto a la dieta normolipídica, de mayor magnitud en las dietas ricas en PUFA n-6 que MUFA n-9, y de estas respecto al grupo control ([5373]). En definitiva, en el global de resultados del estudio del estrés oxidativo en glándula mamaria, los correspondientes a la 8-oxo-dG no son concordantes con los obtenidos en otros parámetros, lo que sugiere que en este trabajo no ha sido un buen marcador de estrés oxidativo tal y como han sugerido otros autores en la literatura ([6074], [7600], [7601]).

El estudio del daño genómico oxidativo en **adenocarcinomas mamarios** únicamente pudo realizarse a través del análisis de la base modificada 8-oxo-dG. Aunque se obtuvieron valores similares en todos los grupos experimentales, los niveles de 8-oxo-dG de los tumores del grupo M<sub>P</sub> fueron significativamente superiores a los del grupo control. Aún así, dado los resultados obtenidos en glándula mamaria, habría de considerar esta diferencia con precaución.

Se ha descrito que el hecho de que un tumor sea más susceptible al estrés oxidativo que las células normales vecinas es debido, en parte, al incremento de la peroxidación lipídica y el daño en el ADN. Sin embargo, estos cambios pueden variar en función de la naturaleza del tumor junto con otros factores ambientales. Como resultado de un aumento de los niveles de ROS en tumor y de una disminución de la capacidad antioxidante, se produce un mayor daño genómico de origen oxidativo respecto al tejido no neoplásico ([5846], [6196]). En relación al cáncer de mama, se ha observado un aumento de los niveles de 8-oxo-dG en tumores respecto al tejido no tumoral ([6788]) e, incluso, una ausencia de cambios ([6776]). Aunque tal y como se acaba de comentar, habría que considerar los resultados de 8-oxo-dG con precaución, cabe hipotetizar que la comparación de los niveles de entre ambos tejidos, glándula y tumor mamario, dio resultados diferentes según el grupo experimental. Así, mientras los adenocarcinomas del grupo M<sub>IP</sub> no mostraron cambios respecto a la glándula mamaria, igual que los del grupo control, los tumores mamarios del grupo M<sub>P</sub> presentaron un aumento significativo del daño genómico respecto a la glándula mamaria. La situación de

menor capacidad antioxidante de los adenocarcinomas mamarios y este elevado nivel de lesiones oxidativas en el ADN del grupo M<sub>P</sub>, sería compatible con el mayor grado de malignidad de los tumores en este grupo ([6721]). En un trabajo previo en el laboratorio no se observaron diferencias en los niveles de 8-oxo-dG en los adenocarcinomas mamarios de grupos equivalentes a M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> de este trabajo, y el control ([6879]). No se han encontrado otros estudios que analicen posibles efectos de los lípidos de la dieta sobre el nivel de 8-oxo-dG, como reflejo de cambios en el estado oxidativo.

A partir de estos resultados se podría plantear que las posibles diferencias en los niveles de peroxidación lipídica por efecto de las dietas ricas en aceite de maíz y en aceite de oliva virgen extra, pudieran reflejarse mejor en los niveles de otro tipo de lesiones del ADN inducidas por productos de la peroxidación lipídica, como los aductos pre-mutagénicos formados por MDA o HNE ([6197], [6433]).

Finalmente, se realizó el **ensayo Comet** con **muestras sanguíneas**, como reflejo del estado general de los animales inducidos. Los resultados del estudio revelaron niveles inferiores a los de la glándula mamaria en todos los grupos experimentales, así como resultados diferentes en función del grupo experimental, lo que sugiere que los valores obtenidos a partir de muestras sanguíneas no siempre reflejan el nivel de daño en tejido. Los grupos de dieta hiperlipídica de maíz mostraron niveles de roturas de ADN similares al grupo control, excepto al final del estudio, en el que M<sub>IP</sub> presentó niveles significativamente superiores. Este resultado es compatible con los mayores niveles de lipofuscina que presentaron los animales de este grupo. En cuanto a la dieta mO20, los resultados fueron diferentes según si ésta se administró antes de la inducción con el carcinógeno o después. Así, mientras que el grupo O<sub>IP</sub> presentó un mayor nivel de roturas a los 36 días de edad, O<sub>P</sub> fue el grupo que mostró unos niveles significativamente superiores respecto al resto de grupos a los 100 días y respecto al control al final del estudio.

La falta de asociación entre los resultados de los tres parámetros de estrés oxidativo analizados en este trabajo (F<sub>2</sub>-IsoP, 8-oxo-dG y ensayo Comet) sugiere que dichos biomarcadores reflejan diferentes vías de estrés oxidativo ([6782]). En este sentido, algunos autores han observado una asociación entre los niveles de F<sub>2</sub>-IsoP y el riesgo de cáncer de mama, pero no con los niveles de 8-oxo-dG ([6781]). Además, cabría tener en cuenta el hecho de haber realizado los ensayos utilizando diferentes muestras biológicas (tejido tumoral mamario, tejido glandular no tumoral y sangre) podría conllevar cierta heterogeneidad en los resultados.

### 1.3. Balance del Estudio del Estrés Oxidativo.

El análisis de los resultados de los parámetros analizados en glándula mamaria a lo largo del estudio sugiere un efecto agudo de las dietas hiperlipídicas en el que la capacidad antioxidante estaría disminuida tras un corto período de exposición a dichas dietas, seguido de una fase de adaptación por parte del organismo. Esta menor capacidad antioxidante se ha observado a los 36 días de edad en la menor expresión y actividad de las enzimas antioxidantes en los grupos de dieta hiperlipídica, así como en la disminución de la expresión de la enzima GSR, lo cual tendría como consecuencia el acumulo de la forma oxidada del glutatión (GSSG). En concordancia con estos resultados, en dichos grupos y a esa edad, se halló un aumento de la relación entre los niveles de las diferentes formas de glutatión (oxidada -GSSG- / reducida -GSH-). Dicha relación es considerada un indicador de estrés oxidativo, el cual estaría aumentado por efecto de las dietas hiperlipídicas, especialmente en los grupos alimentados con dieta rica en aceite de maíz. Este efecto agudo de las dietas hiperlipídicas también ha sido hallado en otros resultados de este trabajo, como los del perfil de expresión génica en glándula mamaria, que serán discutidos posteriormente.

Por otro lado, el perfil de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, así como la expresión de la enzima GSR, sugieren un efecto de la edad en la capacidad antioxidante, la cual va disminuyendo desde la pubertad hasta la madurez. De acuerdo con estos datos, parte de las diferencias observadas en la pubertad podrían estar relacionadas con el efecto de las dietas en la maduración sexual, la cual está claramente avanzada en los grupos de dieta hiperlipídica, especialmente la rica en aceite de maíz. En cuanto al efecto crónico de las dietas hiperlipídicas, es decir, tras un período prolongado de administración, éste probablemente se sumaría al efecto del propio proceso carcinogénico, dando como resultado unos datos mucho más heterogéneos en la glándula mamaria inducida (100 y 246 días). De todas formas, no se puede descartar que la adaptación del organismo a la ingesta crónica de las dietas hiperlipídicas sobre la capacidad antioxidante pudiera haber influenciado en la carcinogénesis. De hecho tal y como ya se ha comentado, los grupos de dietas hiperlipídicas presentaron un distinto rendimiento de la carcinogénesis. En este sentido, el efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas sobre el estrés oxidativo y las consecuencias que se derivan dependerían del tipo de ácido graso, el tiempo de exposición a él y, también, del contexto celular. Así, por ejemplo, una disminución de la capacidad antioxidante podría tener diferentes consecuencias en función de si las vías apoptóticas están, o no, alteradas. En este sentido, el efecto final de la

dieta hiperlipídica de aceite de maíz o de oliva podría ser diferente tal y como han sugerido otros datos como los relacionados con el perfil de expresión génica.

El estudio realizado en adenocarcinomas mamarios reveló una disminución de la capacidad antioxidante respecto al tejido mamario pero no se ha observado un claro efecto de las dietas hiperlipídicas en el estrés oxidativo de este tejido. Sin embargo, a largo plazo hay indicativos de que se podría haber acumulado más daño oxidativo en los grupos de dieta rica en aceite de maíz según el análisis de los niveles de lipofuscina. Tal y como se acaba de comentar, el efecto de cambios en el estrés oxidativo dependería del contexto celular, ya que un aumento de dicho estrés podría suponer una ventaja de selección de las células cancerosas (al suponer una mayor fuente de mutación), como una disminución supondría una protección, siempre y cuando las vías apoptóticas fueran funcionales.

Finalmente, los datos obtenidos en el estudio de otros parámetros de estrés oxidativo (F2-IsoP, 8-oxo-dG y ensayo Comet) analizados en este trabajo no son concordantes con el resto de resultados, lo que sugiere que dichos parámetros reflejan diferentes vías de estrés oxidativo y no han resultado ser unos buenos biomarcadores de daño genómico y peroxidación lipídica en este trabajo. Por otro lado, se podría plantear el análisis de otro tipo de lesiones en el ADN tal como aductos pre-mutagénicos originados por la acción directa de metabolitos de la peroxidación lipídica, como el aducto M<sub>1</sub>G formado por la interacción entre MDA y la base guanina. Otros metabolitos más específicos de la peroxidación lipídica, como el MDA y el HNE, serían útiles para revelar el diferente grado de oxidación según el tipo de ácido graso, además de los efectos de los componentes antioxidantes del aceite de oliva virgen. Asimismo, sería interesante analizar si los lípidos de la dieta podrían estar influenciando a otras enzimas del sistema redox tal como  $\gamma$ -GCS o bien a enzimas de detoxificación de fase II, todas ellas relacionadas con el estado redox celular.

## **2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.**

Los ácidos grasos de la dieta pueden modular la expresión de genes implicados en multitud de funciones biológicas como por ejemplo metabolismo, crecimiento y proliferación celular, o supervivencia y apoptosis ([4541], [4543]). En general, el efecto final puede ser mediado por cambios en la membrana celular y en las vías de transducción de señales, o bien actuando sobre los factores de transcripción de forma directa o indirecta, como por ejemplo

ejerciendo de ligando de dichos factores. Asimismo, se ha asociado la influencia de los ácidos grasos con la regulación de genes implicados en la transformación neoplásica, incluyendo oncogenes y genes supresores de tumores ([4325], [4393], [4541], [4543], [4735], [5965]). Teniendo en cuenta estas evidencias, se ha abordado el estudio de la expresión génica, como mecanismo mediante el cual los lípidos de la dieta podrían ejercer su efecto sobre el cáncer de mama, desde diferentes perspectivas. Por un lado, se investigó el efecto de las dietas hiperlipídicas sobre la expresión de genes en concreto de relevancia en la susceptibilidad o resistencia de la glándula mamaria a la transformación neoplásica, así como en la progresión tumoral. De este modo, se estudió la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, maduración sexual, estado hormonal o estrés oxidativo, tal y como ya ha sido presentado. En una segunda aproximación, se realizó un cribaje de nuevos genes cuya expresión pudiera estar influida por los lípidos de la dieta. Así, se estudió el perfil de expresión génica en glándula mamaria y adenocarcinoma mediante el análisis por *Microarrays* de exones de todo el genoma.

Los resultados obtenidos en el estudio en **glándula mamaria** sugieren que la dieta hiperlipídica n-6 y la de aceite de oliva virgen extra modifican de distinta forma el perfil de expresión génica, sobre todo en las etapas prepuberales, poco tiempo después del inicio de la intervención dietética. Así, a los 36 días de edad, entre los genes diferencialmente expresados respecto al grupo control, se halló un gran porcentaje de genes específicos de grupo, mientras que pocos genes fueron comunes, es decir modulados por ambas dietas hiperlipídicas. En cambio, a la edad de 51 días el porcentaje de genes comunes (diferencialmente expresados por ambas dietas hiperlipídicas) fue estadísticamente superior que a los 36 días. A los 100 días edad, 47 días después de la inducción, con la glándula mamaria posiblemente afectada por el carcinógeno, el análisis reveló pocos genes modulados por efecto de las dietas hiperlipídicas, mientras que al final del estudio (246 días) el número de dichos genes volvió a aumentar. Además, se observaron más cambios de expresión por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz que por la de aceite de oliva virgen extra. En consecuencia, el conjunto de los resultados a lo largo del tiempo sugiere un efecto modulador agudo o más importante en las fases iniciales de la administración de las dietas hiperlipídicas, seguido de una fase en la que la glándula mamaria se adaptaría a la elevada ingesta de ácidos grasos de forma continua. A los 100 días, y fundamentalmente al final del ensayo (246 días) se sumaría el efecto que puedan causar las dietas hiperlipídicas con el del proceso carcinogénico. Este efecto a lo largo

del tiempo también ha sido observado en otros parámetros estudiados en este trabajo, como por ejemplo los relacionados con el estrés oxidativo.

A continuación, se clasificaron los genes diferencialmente infra- o sobreexpresados por su función en procesos biológicos según la base de datos Gene Ontology (GO), y se determinaron las categorías significativamente sobrerrepresentadas. Así, el análisis de las funciones celulares de dichos genes diferencialmente expresados respecto al grupo control también sugiere un efecto distinto de ambos tipos de dieta hiperlipídica. A los 36 días de edad, entre los genes infraexpresados del grupo M<sub>IP</sub> destacaron los relacionados con la apoptosis y el sistema inmunitario, ya que dichas funciones se encontraron sobrerrepresentadas, es decir, el número de genes relacionados con tales categorías funcionales fue superior al teórico teniendo en cuenta todo el genoma de rata. En el caso del grupo O<sub>IP</sub>, se hallaron menos genes diferencialmente expresados por efecto de dicha dieta, y de entre ellos, los infraexpresados estaban relacionados principalmente con el metabolismo. Por otro lado, a los 51 días, el metabolismo fue la categoría funcional enriquecida, en todos los subgrupos de genes (infraexpresados y sobreexpresados) de ambos grupos de dieta hiperlipídica, lo cual estaría en concordancia con la hipótesis de que la fisiología del tejido mamario se adapta a la ingesta elevada de ácidos grasos una vez superado el efecto agudo de éstos. Asimismo, es de destacar que, nuevamente, en el grupo alimentado con la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, se hallaron la apoptosis y la respuesta inmune como categorías funcionales sobrerrepresentadas. A los 100 días de edad apenas se hallaron categorías funcionales destacadas, mientras que al final del estudio (246 días), el metabolismo volvió a destacar de forma común en todos los grupos, tanto en los genes infraexpresados como en los sobreexpresados. También a esta edad los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz (M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>) presentaron de nuevo la apoptosis y el sistema inmune como funciones destacadas de los genes infraexpresados.

La regulación de los genes del metabolismo por ingesta de lípidos está ampliamente documentada en la literatura. Así, se produce la adaptación al aporte exógeno de lípidos, que se acompaña del aumento del transporte de ácidos grasos y de la disminución de su síntesis. Diversos autores describen un aumento de la expresión de genes implicados en dicho transporte desde la membrana celular hasta las mitocondrias y peroxisomas para la oxidación de los ácidos grasos, en respuesta a la ingesta crónica de dietas hiperlipídicas compuestas por diversos ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y polinsaturados) ([7717], [7718], [7719], [7720]). De todas maneras, habría que tener en consideración que el hecho de tener la

enfermedad cancerosa podría modificar la regulación fisiológica del metabolismo lipídico. En este sentido, el grupo investigador describió que en situación de cáncer de mama se modificaba la regulación que los PUFA n-6 realizaban sobre genes del metabolismo lipídico en hígado, lo que sugería que tal modificación estaría relacionada con el redireccionamiento de los ácidos grasos hacia la célula tumoral, posiblemente para ser usados como sustratos energéticos, contribuyendo así a una mayor agresividad tumoral ([4737]). Asimismo, los resultados obtenidos indicarían la importancia de la modulación del metabolismo de lípidos, y sugieren que los cambios observados en el perfil de expresión de este tipo de genes provendrían, al menos en parte, del tejido adiposo mamario, lo cual evidenciaría la importancia de los adipocitos en la biología de la glándula mamaria. En este sentido, numerosos datos en la bibliografía han mostrado la influencia del tejido adiposo en el desarrollo normal y patológico de la glándula mamaria ([5797], [6596], [6597], [7545], [7546], [7716]). Dichos datos son compatibles con los obtenidos en este trabajo, tal y como también se vio reflejado en el estudio de la expresión de adipoquinas en glándula mamaria y tumor, en el que los resultados obtenidos mostraban cambios en la expresión de dichas hormonas compatibles con un aumento de la proliferación celular en dichos tejidos, especialmente en los animales alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz.

De los resultados anteriores, destacan las categorías funcionales de apoptosis y sistema inmunitario. En relación a la primera, los resultados del estudio en glándula mamaria también sugieren una disminución de la apoptosis en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz, ya que fue una de las funciones destacadas entre los genes infraexpresados en los grupos alimentados con dicha dieta a lo largo de todo el estudio (excepto a los 100 días de edad). Asimismo, otros trabajos de la literatura describen una modulación diferencial de la apoptosis según el ácido graso administrado *in vitro* e *in vivo*. Así, algunos autores describen un aumento de la apoptosis al administrar aceite de oliva, pescado y CLA a células de cáncer de mama o colorectal ([4634], [5398]). Se ha descrito este mismo efecto en ratas alimentadas con aceite de pescado, observándose dicho aumento tanto en glándula mamaria como en colon ([5954], [6915]). Por otro lado, se ha descrito una disminución de la expresión genes pro-apoptóticos y de genes implicados en la reparación del ADN en glándula mamaria de ratas alimentadas con dieta rica en PUFA n-3, sugiriendo un mayor acumulo de daño oxidativo que se habría reflejado en el aumento de la tumorigénesis observado en dichas ratas ([6772]). Los resultados obtenidos en este trabajo serían compatibles con una disminución de la apoptosis en la glándula mamaria de las ratas de los grupos M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub>, lo que podría estar en

relación con una mayor susceptibilidad de la glándula mamaria frente al carcinógeno en función de la dieta administrada que se habría visto reflejada en el importante aumento del rendimiento de la carcinogénesis mamaria observada en estos grupos.

Finalmente, destacó la infraexpresión de genes relacionados con el sistema inmune por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Es bien conocida la estrecha y compleja relación existente entre el sistema inmunitario y el cáncer de mama, que puede actuar tanto de forma protectora como promotora, llevando a cabo un papel en la iniciación y en la promoción del cáncer ([7752]). Por un lado, las células del organismo están bajo una constante vigilancia inmunológica (fundamentalmente por parte de linfocitos T y B, macrófagos y células NK -Natural Killer-) que es la responsable del reconocimiento y eliminación de la mayoría de células cancerosas incipientes. A pesar de ello, los tumores que se desarrollan son capaces de evadir el sistema inmunológico ([7693], [7694]). Por otro lado, en la respuesta inmunitaria frente al tumor se produce el reclutamiento de células inflamatorias, como las células T reguladoras, que actúan como inmunosupresores, inhibiendo las acciones de los linfocitos T citotóxicos ([7753], [7754]). La respuesta inmunológica hacia el tumor estaría determinada por el balance entre el reclutamiento de células inflamatorias y de células protectoras (linfocitos T helper 1 y CD8+, y NK) ([7371]).

En la literatura, numerosos trabajos han mostrado un efecto modulador de los lípidos de la dieta sobre el sistema inmune, el cual vendría dado, al menos en parte, por la modificación de la composición de los ácidos grasos de las membranas de las células inmunitarias. Como consecuencia, la señalización intracelular se podría ver afectada, influenciando en la respuesta inmunitaria e inflamatoria que se desencadenaría. Asimismo, los ácidos grasos alterarían la función de las células inmunitarias mediante la interacción directa con dianas intracelulares, incluyendo factores de transcripción, lo cual podría modificar la expresión génica ([7070], [7071]). En este sentido, se ha relacionado una dieta rica en PUFA n-6 con una alteración en la síntesis de eicosanoides que produciría un efecto inmunosupresor, afectando a la producción linfocitaria, la expresión de moléculas de adhesión y a la actividad de las células NK ([1221], [3504], [4155]). Además, los eicosanoides derivados de ácidos grasos tienen distintos efectos según el ácido graso de origen. Así, los derivados del EPA (PUFA n-3) ejercerían un papel anti-inflamatorio, mientras que los derivados del ácido araquidónico (PUFA n-6) llevarían a cabo el efecto contrario a través de la prostaglandina E2 y el leucotrieno B4. Ambas moléculas inflamatorias son producidas mediante las enzimas COX y LOX, para las cuales no representarían un buen sustrato los PUFA n-3 ([4155], [4546], [4547]). Asimismo, se ha

sugerido que las acciones anti-inflamatorias y moduladoras del sistema inmune por parte de los PUFA n-3, deben estar mediadas por mecanismos independientes de eicosanoides, por ejemplo induciendo cambios en el estado antioxidante, en la actividad transcripcional y en vías de señalización intracelular ([4155], [4547], [4992]). En cuanto a la influencia del aceite de oliva sobre la respuesta inmunitaria, es menos conocido que el de otros lípidos, aunque parece ser que ejercería un efecto modulador similar, pero menos efectivo, al que llevan a cabo los ácidos grasos PUFA n-3. Estudios experimentales han demostrado que el efecto anti-inflamatorio e inmunomodulador del aceite de oliva vendría dado por el elevado contenido de ácido oleico y por los componentes no lipídicos, como por ejemplo los polifenoles, los cuales inhiben la actividad de la enzima LOX ([4837], [4972], [7071], [7755]). En humanos, el efecto del aceite de oliva no está bien dilucidado, ya que tras el consumo de dietas ricas en MUFA no siempre se observa un efecto sobre las células inmunitarias ([7071]). No obstante, se ha descrito que tras la ingesta de alimentos ricos en aceite no se activaría la vía del factor de transcripción NFκB en monocitos tal y como hacen otros alimentos ricos en ácidos grasos saturados y PUFA n-3, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio del aceite de oliva. Dicha vía, además, estaría disminuida después de una ingesta crónica de una dieta mediterránea rica en el mismo tipo de aceite ([7120], [7122]). NFκB es un factor de transcripción fundamental en la respuesta pro-inflamatoria, implicado no sólo en la susceptibilidad a la transformación neoplásica, sino también a la progresión tumoral ([7122], [7163]).

En cuanto a los efectos de los lípidos sobre las células del sistema inmunitario en tejido mamario existen muy pocos datos en la bibliografía. Otros autores han hallado una disminución de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular y la inflamación en células mamarias epiteliales de rata y en glándula mamaria de vacas por efecto de distintas dietas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados n-6 ([6319], [7721]). En definitiva, los resultados de este estudio sugieren que una dieta hiperlipídica rica en ácidos grasos PUFA n-6 disminuiría la respuesta inmunitaria en el tejido mamario, lo que podría estar relacionado con un aumento de la susceptibilidad de la glándula a ser transformada neoplásicamente.

Tras la determinación del perfil de expresión génica en la glándula mamaria, se compararon los resultados de expresión de algunos genes de interés que fueron estudiados previamente en este trabajo mediante la técnica de *Real Time*-PCR, con los obtenidos en dicho estudio, observándose unos patrones de expresión muy similares. A pesar de las limitaciones metodológicas (diferencias técnicas y distintos tratamientos estadísticos empleados para los análisis), los resultados obtenidos utilizando ambas metodologías fueron concordantes. No

obstante, habría que tener en consideración las limitaciones de los estudios de expresión génica por *Microarrays*, que explicarían que no siempre se confirmen los resultados obtenidos. Por un lado, como en muchas otras metodologías, en procedimientos tan sofisticados y con múltiples pasos, es necesario minimizar la variabilidad técnica para conseguir detectar las diferencias biológicas y no las metodológicas (relacionadas con la integridad del ARN, el procesamiento de la muestra, las características técnicas del “chip” de *Microarrays*, etc). Pero, sin duda, en el momento actual la principal dificultad, relacionada con la reproducibilidad de los resultados, se encontraría a nivel del análisis e interpretación de los datos. Los tratamientos estadísticos manejan miles de datos, que normalmente provienen de un bajo número de réplicas, y que incluyen múltiples y complejos niveles de procesamiento: cuantificación de las imágenes obtenidas, eliminación del *background*, normalización y filtrado de datos, realización de test estadísticos múltiples, anotación de las funciones de los genes, agrupaciones funcionales, etc ([7715]). En cualquier caso, se desea destacar que el análisis e interpretación de los datos se ha realizado conjuntamente con una experta bioestadística colaboradora del grupo de investigación.

En referencia al estudio del perfil de expresión en **adenocarcinomas mamarios**, se han hallado menos genes diferencialmente expresados por el efecto de las dietas hiperlipídicas en comparación con el número de genes obtenidos en la glándula mamaria, excepto en el grupo O<sub>IP</sub>. Esto podría ser debido, al menos en parte, a la mayor variabilidad entre las muestras como consecuencia del propio proceso carcinogénico, lo cual dificultaría el hallazgo de diferencias por efecto de un factor ambiental como la dieta. Además, se hallaron muy pocos genes modificados de forma común entre los grupos de dieta hiperlipídica, a diferencia de lo ocurrido en glándula mamaria. Esto podría estar relacionado con que el tejido mamario no tumoral se produciría una respuesta fisiológica a la elevada ingesta de lípidos de la dieta, por lo que se induciría la expresión de genes implicados en su metabolización por efecto de ambas dietas. Por el contrario, en el caso del tumor, éste está alejado de la normalidad, por lo que no sería tan evidente la respuesta fisiológica y, en cambio sí se produciría el efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas, el cual se vería reflejado en el menor número de genes comunes diferencialmente expresados.

El análisis de las funciones de todos los genes que se expresaban diferencialmente, mostró, en general, poca especificidad según el grupo, hallándose prácticamente en todos ellos, genes relacionados con metabolismo, proliferación y respuesta a estímulos externos y estrés. Es de destacar, que de igual forma que en glándula mamaria, se hallaron genes infraexpresados relacionados con el sistema inmune y la apoptosis en los grupos alimentados

con la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, mientras que en los grupos de aceite de oliva destacó la sobreexpresión de genes implicados en apoptosis. Tales resultados están en concordancia con un trabajo anterior del grupo investigador donde la apoptosis estaría aumentada en los tumores por efecto de una dieta hiperlipídica de aceite de oliva ([6879]).

Al dividir los genes diferencialmente expresados entre comunes y específicos, volvieron a destacar las categorías funcionales relacionadas con la apoptosis y la respuesta inmunitaria entre los infraexpresados en el grupo M<sub>p</sub>. Tal y como ya se ha comentado anteriormente, es conocido el efecto modulador de los lípidos de la dieta sobre el sistema inmune, así como el distinto efecto que ejercen según el tipo de ácido graso que conforma la dieta. Así, se ha relacionado la administración en ratones de una dieta rica en aceite de cacahuete (PUFA n-9) con la disminución del crecimiento tumoral y metastásico. Este efecto estaría asociado a una menor infiltración leucocitaria mediante la disminución de la actividad de las enzimas LOX, lo que reduciría la formación de eicosanoides, los cuales ejercen un efecto pro-inflamatorio y pro-tumorigénico. Además, dicha dieta estaría aumentando la síntesis de moléculas pro-apoptóticas y disminuyendo la producción de moléculas pro-inflamatorias ([7724]). También, se ha descrito un aumento de células linfocitarias y linfocitos CD8<sup>+</sup> en tumores de colon de ratas inducidas químicamente con DMH (1,2-dimetilhidrazina), y expuestas durante el desarrollo pre- y/o post-natal, a una dieta hiperlipídica de aceite de oliva. Los autores sugerían que el hecho de alimentar a las ratas gestantes con dicha dieta confería un efecto inhibitorio de la carcinogénesis a nivel celular en su descendencia ([4837]). Por otro lado, se ha sugerido que la expresión de genes del sistema inmune podría reflejar el grado de infiltración linfocitaria en glándula mamaria ([7722]). Estas evidencias podrían estar en relación con los resultados obtenidos en este estudio en los que la disminución de este tipo de genes en los tumores del grupo M<sub>p</sub> representaría un menor grado de infiltración linfocitaria, con la consecuente evasión del sistema inmunitario que podría verse reflejado en el mayor grado de malignidad clínica y anatomopatológica observada en estos tumores.

En relación a la apoptosis, los resultados sugieren un efecto diferencial de los dos tipos de dietas, así la hiperlipídica de aceite de maíz estaría disminuyendo dicha función, mientras que en el caso de la de aceite de oliva, la estaría aumentando. Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente por el grupo, que mostraban dicho efecto diferencial de ambos tipos de dieta hiperlipídica. Así, en una serie experimental anterior la dieta hiperlipídica de aceite de oliva aumentó la apoptosis en adenocarcinomas mamarios y, promovió cambios en las vías de señalización de Ras asociados a un balance proliferación/apoptosis a favor de esta última. Sin

embargo, la dieta hiperlipídica de aceite de maíz mostró un efecto contrario, estimulando la supervivencia de las células transformadas y, a su vez favoreciendo el proceso carcinogénico ([5321], [6879]). Todos estos resultados serían compatibles con los obtenidos en ambas series experimentales sobre el fenotipo tumoral, más benigno en el caso de los tumores de ratas alimentadas con la dieta hiperlipídica de aceite de oliva, mientras que los de los animales alimentados con la de aceite de maíz fueron biológicamente más agresivos ([4303], [6879], [7751]). Otros autores también han hallado dicho efecto diferencial en función del tipo de ácido graso. Se ha descrito una estimulación de la apoptosis por efecto de ácidos grasos  $\omega$ -3 y una disminución por efecto de los  $\omega$ -6 en células de cáncer de mama ([7150], [7154]). *In vivo* se ha hallado un efecto de la dieta a largo plazo tras la exposición prenatal. Así, se ha observado un aumento de genes anti-apoptóticos en tumores mamarios de ratas cuyas madres habían sido alimentadas con dietas del 15% de aceite de maíz durante la gestación, mientras que las glándulas y los tumores mamarios de la descendencia de ratas alimentadas con dietas al 7% y 15% de aceite de oliva presentaban un aumento de expresión de genes pro-apoptóticos ([5127]).

El efecto diferencial de las dos dietas experimentales sobre el perfil de expresión génica en tumores mamarios inducidos con DMBA había sido previamente descrito por el grupo investigador, utilizando una metodología menos potente/exhaustiva en los que se analizaron 5184 secuencias. Así, se halló una disminución de la expresión de genes implicados en la diferenciación celular (VDUP1, H19 ó  $\alpha$ -2u globulina) en adenocarcinomas mamarios de ratas alimentadas con dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Estos genes no se hallaban modificados por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva. Dichos tumores mostraron a su vez un fenotipo anatomopatológico más maligno, sugiriendo de nuevo el papel estimulador en el proceso carcinogénico de los ácidos grasos PUFA n-6 que iría acompañado de cambios en el perfil de expresión génica ([4735], [7097]).

Por último, se inició la validación mediante *Real Time*-PCR de los resultados obtenidos en adenocarcinomas mamarios en el estudio por *Microarrays*. Así, se estudió la expresión de 9 genes, tanto comunes como específicos de cada grupo experimental, e implicados en diferentes funciones celulares. El análisis se realizó, en primer lugar, en las mismas muestras, y se observó, en general, un perfil de expresión de los genes seleccionados muy similar entre ambas técnicas, a pesar de las diferencias metodológicas y de tratamiento estadístico comentadas anteriormente. En el caso de Smad1 y Fhl1 se perdió la significación estadística, y únicamente el gen Gja1 mostró un patrón de expresión distinto. Al ampliar el número de muestras analizadas se observaron cambios en las tendencias observadas. Así, se

mantuvo dicha tendencia en el caso de los genes infraexpresados (*Scd1*) y sobreexpresados (*Notch4* y *Fabp3*) en todos los grupos de dieta hiperlipídica, y de forma menos clara en los genes *Jak2* y *Cdkn2b*. Por otra parte, *Smad1* mantuvo el mismo perfil de expresión, mientras que *IL18*, *Fhl1* y *Gja1* mostraron otras tendencias al aumentar el número de efectivos.

La modulación de la expresión de *Scd1* y *Fabp3* observada, en general, en todos los grupos de dieta hiperlipídica se halla en concordancia con otros trabajos de la literatura y con lo mencionado anteriormente sobre la disminución de la síntesis de ácidos grasos y el aumento de su transporte por efecto del aporte exógeno constante de lípidos. Esteroil-CoA desaturasa (*Scd*) es una enzima que introduce un doble enlace a ácidos grasos saturados, transformándolos en MUFA. El aporte de grandes cantidades de ácidos grasos insaturados, proporcionados en ambas dietas hiperlipídicas, disminuiría la necesidad de esta enzima. De hecho, la infraexpresión de *Scd1* se ha observado en los tumores de todos los grupos de dieta hiperlipídica, así como en glándula mamaria en casi todas las edades y grupos de dieta hiperlipídica. En el mismo sentido, se ha descrito una disminución de la expresión de *Scd1* por efecto de dietas suplementadas con ácidos grasos PUFA n-3 y n-6 en glándula mamaria, hígado y tejido adiposo de ratones y vacas ([7733], [7747], [7748]). Asimismo, se ha relacionado la deficiencia de *Scd1* con la disminución y el aumento de la expresión de genes implicados en la síntesis y oxidación, respectivamente, de ácidos grasos ([7729], [7731]). Por otro lado, *Scd1* parece tener su expresión aumentada en distintos tipos de cáncer (mama, pulmón, colorectal, ovárico, carcinoma hepatocelular, etc) sugiriendo que desarrolla un papel en la progresión de dicha patología manteniendo un flujo ininterrumpido de metabolitos para la biosíntesis de lípidos celulares lo que sugiere que en los tumores de este trabajo dicho flujo estaría ampliamente asegurado ([7726], [7727], [7730]). En cuanto a la proteína de unión a ácidos grasos tipo 3 (*Fabp3*), está implicada en la captación y transporte de ácidos grasos de cadena larga, así como en la interacción de estos con otras moléculas, participando en la modulación de muchos procesos celulares que incluyen la transducción de señales, expresión génica, crecimiento y diferenciación ([7728], [7729], [7733]). Esta proteína parece expresarse en función de la demanda celular para procesar los ácidos grasos de cadena larga ([7749]). Según la información disponible, hasta ahora no se ha descrito el efecto que pudiera ejercer una dieta hiperlipídica de aceite de maíz y de oliva virgen extra sobre la expresión de *Fabp3* en adenocarcinomas mamarios. Únicamente un trabajo revela un aumento de proteína *Fabp3* en músculo esquelético por efecto de una dieta hiperlipídica comercial (60% de energía) ([7739]). Por otro lado, también se ha descrito un aumento de la expresión de *Fabp3* en cáncer de mama y pulmón

([7737], [7738]). Sin embargo, en la literatura también se ha sugerido un papel estimulador en la diferenciación de las células epiteliales mamarias así como en la disminución de la proliferación celular actuando como supresor tumoral ([7734], [7735], [7736]).

Por otra parte, se observó un aumento de expresión de Notch4 en los adenocarcinomas mamarios de los grupos de dieta hiperlipídica, sobre todo en los alimentados con la de aceite de oliva y en M<sub>IP</sub>, lo cual también ha sido descrito en líneas celulares de cáncer de mama ([6922], [7740], [7741]). Ha sido ampliamente descrita la implicación de la familia de genes Notch en la carcinogénesis regulando la expresión de genes relacionados con el destino celular, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, así como la autorenovación tisular ([7742], [7743], [7744]). Más recientemente, se ha descrito que, aparte del papel oncogénico, esta familia de genes actuaría como supresor tumoral según el contexto celular. En este sentido, Notch4 estaría implicado en el papel oncogénico, mientras que otras isoformas como Notch1 o 2, activarían vías de señalización contrarias a la progresión carcinogénica ([7744], [7745]). Por otro lado, la expresión de Notch4 en células de cáncer de mama estaría estimulando la proliferación celular a través de la inhibición de TGF $\beta$  ([7741], [7746]). Asimismo, se ha descrito una activación de Bcl-2 por parte de Notch4, así como una inhibición de la vía JNK, ejerciendo así una acción anti-apoptótica. En este caso, el aumento de expresión se dio en ambos grupos de dieta hiperlipídica, por lo que Notch4 no estaría reflejando la diferente modulación de la apoptosis por parte de las dietas observada en el análisis de enriquecimiento funcional y en los mecanismos descritos anteriormente en otra serie experimental realizada por el grupo investigador ([6879], [7375]). Según otros autores, Notch4 también estaría implicado en la activación de las vías efectoras de Ras Erk/MAPKinasas y PI3Kinasa. Aunque en este estudio no se observó un efecto diferencial de las dietas sobre la expresión de Notch4, el grupo investigador anteriormente describió dicho efecto diferencial sobre las vías efectoras de Ras, lo que sugiere que este efecto sería independiente de Notch4 ([6879], [6922]). En cualquier caso, el aumento de este gen en todos los grupos de dieta hiperlipídica podría estar en relación al aumento de la carcinogénesis de dichos grupos respecto al control, aunque no reflejaría el efecto débilmente promotor del aceite de oliva en comparación con el claramente estimulador del aceite de maíz.

En cuanto al aumento observado en M<sub>IP</sub> de Jak2 respecto al resto de grupos, éste sugiere que los tumores de dicho grupo tendrían un comportamiento más agresivo debido al papel estimulador de Jak2 del crecimiento y la supervivencia de las células tumorales, así como de su capacidad para regular la expresión de genes implicados en la diferenciación y apoptosis celular ([7756], [7757], [7758]). En la literatura se ha descrito que una desregulación de la vía

Jak2/Stat5 está relacionada con la autosuficiencia de las señales de crecimiento y la evasión de la apoptosis, por lo que se facilitaría la progresión tumoral ([3973]). Por otro lado, el aumento de la expresión de Cdkn2b observado en el grupo O<sub>P</sub> y la disminución de la expresión de Smad1 en ambos grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva, podría estar relacionado con las características de menor grado de malignidad de los tumores de dichos grupos (características anatomopatológicas y menor volumen tumoral). Estos genes están implicados en funciones clave para la modulación del proceso carcinogénico. Smad1 ha sido relacionado con la proliferación y migración de células tumorales en cáncer de mama ([7759]). En el caso de Cdkn2b, éste es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina, que están implicadas en la progresión del ciclo celular, por lo que la tendencia al aumento de la expresión de Cdkn2b en el grupo O<sub>P</sub> obtenido en este estudio, estaría modulando negativamente la proliferación celular. Asimismo, se ha descrito una asociación entre la disminución de la expresión de Cdkn2b y un fenotipo tumoral más agresivo y maligno en varios tipos de cáncer entre los cuales se encuentra el de mama ([7760], [7761], [7762]).

Sea como fuere, el conjunto de los resultados muestra de forma concordante un efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de oliva virgen extra sobre el perfil de expresión génica, y una disminución de la expresión de genes relacionados con funciones básicas como el sistema inmune y la apoptosis a varias edades y en ambos tejidos, normal y tumoral, por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz. A pesar de las limitaciones metodológicas de los *Microarrays*, fundamentalmente relacionadas con el número de muestras analizadas y la baja reproductibilidad, los resultados obtenidos son de interés teniendo en cuenta que la modulación de este tipo de genes podría estar relacionado con el diferente comportamiento clínico y características anatomopatológicas de los tumores, de mayor grado de malignidad por influencia de la dieta hiperlipídica PUFA n-6. En base a ello, sería necesario seguir analizando los datos obtenidos y validando otros genes de interés relacionados con las funciones celulares que se han hallado sobrerrepresentadas en este estudio.

#### **D. BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS.**

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto el efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas utilizadas en relación al peso y la masa corporal de los animales. Así, mientras que la administración en grandes cantidades de grasas ricas en PUFA n-6 se asociaría a un aumento de dichos parámetros, en el caso de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, a pesar de contener la misma elevada cantidad de lípidos, no aumentaría el peso ni la masa corporal, lo que indica la importancia no sólo de la cantidad, sino también del tipo de lípido ingerido para el mantenimiento del peso corporal. Este efecto de la dieta rica en PUFA n-6 no se observó cuando ésta fue administrada después de la inducción con el carcinógeno (grupo M<sub>p</sub>). Esta ausencia de efecto podría estar relacionada con el mayor grado de malignidad biológica de los tumores de los animales del grupo M<sub>p</sub>. Es un hecho bien conocido que existe una asociación entre la agresividad de la enfermedad cancerosa y la pérdida de peso corporal. La demanda energética aumentada resultante del proceso canceroso lleva al organismo a la caquexia ([7789]). Los mecanismos mediante los cuales las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de oliva virgen extra, ejercerían este efecto diferencial estarían relacionados directamente con el tipo de ácido graso administrado, afectando al destino metabólico de las grasas. En este estudio ambas dietas hiperlipídicas aumentaron genes del metabolismo lipídico (PPAR $\alpha$ , CPT-1a y L-FABP), pero únicamente la dieta de aceite de oliva aumentó la expresión de UCP-2. Este gen constituye una diana molecular indirecta de la OEA, su función consiste en facilitar la disipación de la energía de la ingesta calórica y disminuye, por lo tanto, su almacenamiento ([7495]). En este sentido, la OEA sería una candidata en la mediación de este efecto por parte del aceite de oliva en relación al peso y la masa corporal, ya que es una molécula derivada del ácido oleico generada en el enterocito ([7177]).

Una de las principales consecuencias de la administración de las dietas hiperlipídicas fue el avance de la pubertad. Aunque ambas dietas la adelantaron, el efecto fue superior en el caso de la de aceite de maíz, induciendo el inicio de la maduración sexual a una edad más temprana. Tal situación ha sido reflejada en varios datos del estudio desde diferentes aproximaciones. Así, a nivel clínico se observó que los animales alimentados con dieta hiperlipídica, especialmente la rica en PUFA n-6, llegaron antes a cada uno de los estados de apertura vaginal y presentaron un mayor peso corporal respecto a los otros grupos que aún se hallaban en estados previos de maduración. No obstante, las dietas hiperlipídicas no modificaron el proceso fisiológico de maduración, de manera que el tiempo transcurrido entre los distintos estados de apertura vaginal fue siempre el mismo independientemente del día de

inicio. Por otro lado, a nivel morfológico, ambos grupos de dieta hiperlipídica mostraron un aumento de su fertilidad en edades post-puberales (número de cuerpos lúteos y de actividad endometrial) asociada al adelantamiento del inicio de la pubertad, así como un aumento de estructuras epiteliales diferenciadas en la glándula mamaria, reflejando el diferente momento de maduración glandular entre los grupos experimentales para una misma edad. Asimismo, a nivel molecular, se halló en edad puberal un aumento de la Kisspeptina hipotalámica en los animales alimentados con dieta rica en aceite de maíz, pero no en los alimentados con la de aceite de oliva. Este aumento se asoció al adelantamiento del inicio de la pubertad ya que Kisspeptina está considerada el desencadenante principal de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal ([7619]). Otros datos moleculares también serían concordantes con la distinta velocidad de maduración por efecto de las dietas hiperlipídicas, tal y como se vio reflejado en el aumento en glándula mamaria de la relación entre los niveles de expresión de Leptina y Adiponectina en edades alrededor de la pubertad, y que son concordantes con una mayor proliferación en los grupos de dieta hiperlipídica, posiblemente asociada al desarrollo glandular. También cabe señalar que datos obtenidos en el estudio del estrés oxidativo son compatibles con este diferente momento de maduración. Así, por una parte se había observado un efecto de la edad en la capacidad antioxidante de la glándula mamaria, en el sentido de que ésta disminuye desde la pubertad hasta la madurez. Por otra parte, esta situación se dio en los grupos de animales alimentados con ambas dietas hiperlipídicas. En ambos grupos se redujo la capacidad antioxidante a los 36 días de edad (menor expresión y actividad de las enzimas antioxidantes y de la GSR), lo que podría estar relacionado, al menos en parte, con el adelantamiento de la maduración sexual hallada en estos grupos.

El avance de la pubertad en humanos (menarquia precoz) está considerado uno de los factores de riesgo de cáncer de mama, ya que aumentaría la exposición a estrógenos a lo largo de la vida y el número de ciclos menstruales en los cuales la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución. Como consecuencia, se ha descrito que la probabilidad de la aparición y acumulo de mutaciones espontáneas aumentaría y generaría una mayor susceptibilidad de la glándula a ser transformada neoplásicamente ([5975]). Otros datos obtenidos en este estudio irían en este sentido, creando un contexto glandular más susceptible a la transformación neoplásica por efecto de las dietas hiperlipídicas. Así, el estudio morfológico reveló, en ambos grupos de dieta hiperlipídica y fundamentalmente en M<sub>IP</sub>, un mayor número de estructuras epiteliales indiferenciadas, las cuales son más susceptibles a la acción del carcinógeno ([3122], [5967]), justo antes de la inducción con el mismo. Sin embargo, no es

descartable que al modificar el grado de diferenciación de la glándula mamaria en el momento de la inducción, se podría haber desplazado la ventana de susceptibilidad a la transformación neoplásica, por lo que el efecto de las dietas hiperlipídicas (probablemente diferente) en la iniciación de la carcinogénesis es difícil de precisar. En cualquier caso, los datos obtenidos indican una influencia de dichas dietas en el rendimiento de la carcinogénesis, tal y como se comentará posteriormente. Por otro lado, los resultados del estudio del estrés oxidativo revelan que la capacidad antioxidante en la glándula mamaria a los 36 días de edad estaba disminuida por efecto de las dietas hiperlipídicas, sugiriendo, además, un efecto agudo de éstas. Esta disminución se vio reflejada en la menor expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, y en la menor expresión de GSR, lo cual favorecería el acumulo de la forma oxidada de Glutati6n, tal y como mostr6 el aumento de la relaci6n entre ambas formas de Glutati6n (oxidada -GSSG- y reducida -GSH-). Los resultados del perfil de expresi6n g6nica a lo largo del tiempo sugiri6 tambi6n un efecto modulador agudo o m6s importante en las fases iniciales de la administraci6n de las dietas hiperlipídicas, seguido de una fase en la que la glándula mamaria se adaptaría a la elevada ingesta de ácidos grasos de forma continua. Aunque la susceptibilidad de la glándula mamaria a la transformaci6n neoplásica habría sido aumentada por ambos tipos de dieta hiperlipídica mediante todos estos posibles efectos, la dieta rica en aceite de maíz tendría una mayor influencia en dicha susceptibilidad glandular. Esta dieta tendría un efecto ańadido en el que se modificaría a la baja la expresi6n de genes implicados en funciones tan importantes como son la apoptosis y la respuesta inmunitaria (véase en Resultados), contribuyendo aún m6s al aumento de la vulnerabilidad de la glándula mamaria.

La ingesta cr6nica de las dietas hiperlipídicas indujo cambios en la glándula mamaria observables a largo plazo, y seg6n los datos obtenidos las dietas ejercieron un efecto diferencial. Así, las glándulas de los animales alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz, contrariamente a los de dieta de aceite de oliva, presentaron una mayor densidad. El mayor n6mero de estructuras proliferativas an6malas, principalmente hiperplasias, halladas en el estudio morfol6gico habría contribuido al aumento de dicha densidad. Por otro lado, el aumento de la relaci6n entre los niveles de Leptina y Adiponectina sugiri6 que las glándulas mamarias al final del estudio presentaban una mayor proliferaci6n por efecto de ambas dietas hiperlipídicas. Adem6s de su papel en la proliferaci6n y desarrollo en la glándula mamaria, tanto Leptina como Adiponectina son genes implicados en el metabolismo lipídico ([6596]), la expresi6n de los cuales ha sido modificada por efecto de las dietas hiperlipídicas. En este sentido, en el estudio del perfil de expresi6n g6nica realizado en glándula mamaria destac6 la modulaci6n de numerosos genes

implicados en el metabolismo (véase en Resultados) por efecto de dichas dietas. Algunos de estos genes fueron modulados por ambas dietas, y otros regulados específicamente en cada grupo experimental, por lo que en un futuro se contempla la idea de dilucidar cuales de estos genes formarían parte del procesamiento fisiológico normal por la ingesta calórica elevada, y cuales estarían relacionados con el efecto específico de las dietas experimentales.

Todas estas observaciones se relacionan también con el efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas en las características clínicas y anatomopatológicas de los adenocarcinomas mamarios. Con respecto a la dieta rica en aceite de maíz, ésta mostró un claro efecto estimulador, fundamentalmente promotor de la carcinogénesis mamaria experimental. En todos los parámetros analizados se hallaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con dicha dieta y el grupo control. En este sentido, se observó un mayor número de animales afectados, así como unas características tumorales de mayor grado de malignidad, como son el menor tiempo de latencia, y el elevado contenido y volumen tumorales. En el mismo sentido, los datos anatomopatológicos, muestran un mayor grado de agresividad tumoral en los adenocarcinomas de los grupos alimentados con este tipo de dieta rica en aceite de maíz con un mayor grado histopatológico, reactividad estromal y necrosis tumoral. El estudio morfológico de la glándula mamaria también reveló datos en concordancia con la disminución del tiempo de latencia en M<sub>IP</sub>, ya que este grupo fue el único que presentó microestructuras tumorales a 100 días de edad. Por otro lado, los adenocarcinomas de los grupos alimentados con la dieta rica en PUFA n-6 también presentaron una serie de características moleculares compatibles con un mayor grado de malignidad, como es la disminución de la expresión de genes implicados en apoptosis y en la respuesta inmunitaria, tal y como se observó en el estudio del perfil de expresión génica de los tumores del grupo M<sub>P</sub> (véase en Resultados). El aumento de la relación entre los niveles del RE $\alpha$  y  $\beta$ , así como de la relación entre las adipocinas Leptina y Adiponectina en los adenocarcinomas mamarios de los grupos alimentados con la dieta hiperlipídica PUFA n-6, sugiere un aumento de la proliferación en dichos tumores, reflejando posiblemente el aumento de la actividad mitótica observada, y colaborando en la mayor malignidad de éstos. Además, en este contexto molecular también contribuiría el aumento de los niveles de estrés oxidativo debido a la ingesta de dicha dieta, tal y como revelan los elevados niveles de lipofuscina en hígado, especialmente en el grupo M<sub>IP</sub>. Este mayor estrés oxidativo posiblemente sea debido a la elevada ingesta de lípidos y al hecho de que el aceite de maíz está conformado por ácidos grasos más susceptibles a sufrir oxidación y convertirse en radicales libres ([6422]).

En cuanto al efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva, ésta mostró una respuesta diferente según la duración de la administración de la misma. Así, mientras que en una primera fase del estudio (aproximadamente hasta los 100 - 125 días post-inducción), la carcinogénesis evolucionó de forma parecida al grupo control, para períodos más largos se observó un débil efecto estimulador, tal y como revelaron los parámetros clínicos del tiempo de latencia o el aumento del contenido y volumen tumorales. Sin embargo, a pesar de ello, los grupos alimentados con dicha dieta mostraron un grado histopatológico y una incidencia tumoral similar a los del grupo control y menor que los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Otros datos de este trabajo sugieren este menor grado de malignidad por efecto de la dieta rica en aceite de oliva, en comparación con la rica en aceite de maíz, como es el menor número de estructuras proliferativas anómalas (PIDL y H) halladas en el grupo O<sub>IP</sub>, destacando además que no aparecieron hasta el final del estudio. Estos resultados serían concordantes con los bajos niveles de Glutación hallados en glándula mamaria de dicho grupo en edades posteriores a la inducción con el carcinógeno. Tal y como se ha descrito en la literatura, esta disminución de los niveles de Glutación sugieren una activación de las vías apoptóticas, eliminando así las células transformadas o bien deteniendo la proliferación celular ([6075], [6759]). En este sentido, según el estudio del perfil de expresión génica en los adenocarcinomas mamarios, ambos grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva mostraron un aumento de expresión de genes implicados en la apoptosis (véase en Resultados), así como la disminución de la expresión de Smad1, la cual está implicada en la proliferación y migración de células tumorales ([7759]). El aumento de expresión de Cdkn2b en el grupo O<sub>P</sub> también sugiere una modulación negativa de la proliferación celular que está en concordancia con el volumen tumoral y el número de mitosis que presentaron los adenocarcinomas de este grupo, que fue similar al del grupo control.

En relación a otros efectos que han sido identificados al comparar el tejido normal con el tumoral, se encontrarían las alteraciones en los mecanismos antioxidantes y de peroxidación lipídica que podrían haber influenciado en la progresión del proceso carcinogénico. En este sentido, en este trabajo se halló una disminución de la capacidad antioxidante en los adenocarcinomas mamarios respecto al tejido glandular, que se manifestó en niveles de expresión y de actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y Catalasa) inferiores a los de la glándula mamaria al final del estudio, así como en el aumento de los niveles de Glutación y de la relación entre ambas formas, oxidada (GSSG) y reducida (GSH), independientemente del tipo de dieta. Por otro lado, el estudio del perfil de expresión génica mostró que los adenocarcinomas mamarios al final del estudio presentaron un menor número de genes

diferencialmente expresados por el efecto de las dietas hiperlipídicas, en comparación con el número de genes obtenidos en la glándula mamaria. Esto podría ser debido, al menos en parte, a la mayor variabilidad entre las muestras que es habitual en el proceso carcinogénico, lo cual dificultaría el hallazgo de diferencias por efecto de un factor ambiental como la dieta.

Finalmente, habría que mencionar que algunos parámetros analizados en este trabajo, esenciales en la maduración sexual y el cáncer de mama, y en los que se deberían haber encontrado cambios, no han revelado diferencias por efecto de las dietas hiperlipídicas. Tal es el caso de los datos obtenidos en el estudio hormonal o en los niveles de Leptina y su receptor. Esto podría estar relacionado con motivos metodológicos y con la naturaleza cíclica de las hormonas, que dificultarían la detección de cambios por efecto de las dietas experimentales. En cuanto a los receptores hormonales en glándula mamaria y tumor, los resultados mostraron en general pocas diferencias significativas. Así, a pesar de la relevancia del estado hormonal en el desarrollo del cáncer de mama, los lípidos de la dieta no parecen alterar significativamente dicho estado ni ejercer sus efectos moduladores de la carcinogénesis mamaria experimental a este nivel. Este resultado ha sido obtenido en este trabajo y en un estudio anterior del grupo investigador, donde además de las hormonas y sus receptores, tampoco se vio modificado otro importante factor de los implicados en la patogénesis del cáncer de mama, el oncogén c-erbB2/Neu ([6879]). Por otra parte, algunos de los datos obtenidos en el estudio de estrés oxidativo (F2-IsoP, 8-oxo-dG y ensayo Comet) no son concordantes con el resto de resultados del estrés oxidativo, lo que sugiere que podrían estar reflejando diferentes vías de estrés oxidativo y que no han resultado ser unos buenos biomarcadores de daño genómico y peroxidación lipídica en este trabajo.

En conclusión, el conjunto de resultados sugiere que en la influencia que ejercen los lípidos de la dieta en la maduración sexual y en la carcinogénesis experimental, no sólo es importante la cantidad de grasas ingeridas sino también el tipo de éstas. Ejemplo de ello sería que en este trabajo, aún administrando dos dietas con la misma elevada cantidad de distintos ácidos grasos, se ha hallado un efecto diferencial de ambas dietas en muchos parámetros estudiados. En este sentido, los datos sugieren que en el caso de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, los ácidos grasos que la componen, así como los numerosos componentes minoritarios bioactivos, actuarían ejerciendo un papel más parecido a la dieta control normolipídica en la maduración sexual y en la carcinogénesis experimental.



**INTRODUCCIÓN**  
**MATERIAL & MÉTODOS**  
**RESULTADOS**  
**DISCUSIÓN**  
**CONCLUSIONES**  
**BIBLIOGRAFÍA**



**1. Del estudio de la influencia de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz (rica en PUFA n-6) y de aceite de oliva virgen extra (rica en MUFA n-9 y componentes bioactivos), sobre el crecimiento y la maduración sexual de los animales:**

1.1. En el estudio del crecimiento:

- a. La dieta rica en PUFA n-6 aumenta el peso y la masa corporal, fundamentalmente tras un largo período de administración, contrariamente a la dieta rica en aceite de oliva virgen extra que presenta un efecto similar a la dieta control normolipídica.
- b. La ingesta de ambas dietas, aumenta la expresión hepática de genes implicados en el metabolismo lipídico (PPAR $\alpha$ , CPT-1a y L-FABP), pero únicamente la rica en aceite de oliva virgen extra aumenta la expresión de UCP-2, lo que sugiere una modulación del equilibrio gasto/depósito con un aumento de la disipación de la energía y una disminución del almacenamiento de los ácidos grasos, contribuyendo así al mantenimiento del peso corporal.

1.2. En relación a la maduración sexual, las dietas hiperlipídicas, fundamentalmente la rica en aceite de maíz, adelantan el inicio de la pubertad. Así:

- a. Clínicamente, los animales alimentados con dichas dietas, especialmente la rica en PUFA n-6, alcanzan antes cada uno de los estados de apertura vaginal. Este proceso está relacionado con la adquisición más temprana del peso corporal adecuado para la maduración sexual.
- b. A nivel morfológico, los animales alimentados con ambas dietas muestran un mayor número de cuerpos lúteos y actividad endometrial indicando el aumento de su fertilidad en edades post-puberales.
- c. A nivel molecular, la dieta hiperlipídica de aceite de maíz aumenta la expresión hipotalámica de Kisspeptina, desencadenante principal del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Sin embargo, no se hallan diferencias en los niveles plasmáticos de la hormona Leptina ni la expresión de los respectivos receptores en hipotálamo.
- d. No se han observado cambios en el estudio del estado hormonal (niveles plasmáticos de LH, FSH, estradiol y progesterona, y la expresión de los receptores esteroideos en glándula mamaria) por efecto de las dietas hiperlipídicas, por lo que dicho estudio no refleja los cambios observados en el adelantamiento de la maduración sexual en los animales alimentados con dichas dietas.

1.3. Las dietas hiperlipídicas influyen en el estado de diferenciación de la glándula mamaria:

- a. Ambas dietas aumentan el número de estructuras epiteliales diferenciadas e indiferenciadas en dicha glándula durante la pubertad. En edad post-puberal, aumentan el número de estructuras indiferenciadas, más susceptibles a la acción del carcinógeno, justo antes de la inducción con el mismo, lo que sugiere un contexto glandular más vulnerable a la transformación neoplásica. En edades post-inducción, la administración prolongada de dichas dietas, particularmente la de aceite de maíz, disminuye el grado de diferenciación morfológica.
- b. Al final del estudio, los animales alimentados con dieta rica en PUFA n-6 presentan mayor densidad glandular, mientras que las glándulas de los animales alimentados con dieta rica en aceite de oliva son las de menor densidad.
- c. Las dietas hiperlipídicas no provocan, en general, cambios significativos en los niveles de las adipoquinas (Leptina, ObR y Adiponectina) ni en PPAR $\gamma$  en glándula mamaria. Sin embargo, la relación Leptina/Adiponectina aumenta en los grupos de dieta hiperlipídica en edades alrededor de la pubertad, especialmente en M<sub>IP</sub>, y al final del estudio, lo que sugiere una glándula mamaria más proliferativa en estos grupos.

**2. Del análisis del efecto modulador de estos lípidos administrados en distintas etapas del desarrollo sobre la carcinogénesis mamaria inducida experimentalmente:**

2.1. Los adenocarcinomas de los animales alimentados con dieta rica en aceite de maíz tienen características anatomopatológicas compatibles con una mayor agresividad biológica (mayor grado histopatológico, reacción estromal y necrosis tumoral), mientras que los adenocarcinomas de los animales alimentados con dieta rica de aceite de oliva muestran características propias de un grado de mayor benignidad, similares a las del grupo control.

2.2. El estudio de los parámetros clínicos de la carcinogénesis muestra que:

- a. La dieta rica en PUFA n-6 ejerce un claro efecto estimulador, fundamentalmente promotor, del cáncer de mama experimental, que se manifiesta en un comportamiento clínico más maligno de los adenocarcinomas respecto a la dieta control y a la rica en aceite de oliva virgen extra (aparición temprana de los tumores, mayor número de animales afectados, y mayor contenido y volumen tumorales).
- b. La dieta hiperlipídica de aceite de oliva mostró una respuesta diferente según la duración de la administración de la misma. Así, mientras que en una primera fase del estudio (hasta

los 100-125 días post-inducción) el efecto sobre la carcinogénesis fue similar al de la dieta control, para períodos más largos ejerció un efecto débilmente estimulador (menor tiempo de latencia, y elevado contenido y volumen tumorales).

- 2.3. Las dietas hiperlipídicas aumentan el número de microestructuras proliferativas anómalas, benignas y potencialmente malignas, en la glándula mamaria.
- 2.4. A pesar de la relevancia del estado hormonal en el desarrollo del cáncer de mama, los lípidos de la dieta no parecen alterar los niveles de expresión de los receptores hormonales en los adenocarcinomas mamarios. Aún así, el aumento de la relación  $RE\alpha/RE\beta$  en los adenocarcinomas del grupo  $M_{IP}$ , podría estar relacionado con una mayor proliferación celular en dichos tumores.
- 2.5. En adenocarcinomas mamarios, los niveles de expresión de Leptina y su receptor no muestran cambios por efecto de las dietas hiperlipídicas, mientras que la expresión de Adiponectina y  $PPAR\gamma$  disminuye en los grupos alimentados con dichas dietas. Asimismo, la relación Leptina/Adiponectina está aumentada en el grupo  $M_p$ , lo cual concuerda con una mayor proliferación celular en los tumores de dicho grupo.

### **3. De la determinación de los mecanismos a través de los cuales las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz y de aceite de oliva virgen extra podrían ejercer su efecto modulador sobre la carcinogénesis mamaria experimental, en función del período de exposición:**

- 3.1. Del estudio sobre el estado de estrés oxidativo:
  - a. El perfil de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y Catalasa), así como la expresión de la enzima GSR, sugieren un “efecto edad” en la capacidad antioxidante, la cual va disminuyendo desde la pubertad hasta la madurez.
  - b. Las dietas hiperlipídicas ejercen un efecto agudo en la glándula mamaria en el que la capacidad antioxidante disminuye tras un corto período de exposición a dichas dietas, seguido de una fase de adaptación por parte del organismo, tal y como refleja el estudio de las enzimas antioxidantes y de GSR.
  - c. En la glándula mamaria de los grupos alimentados con dieta hiperlipídica, especialmente en  $M_{IP}$ , asociado a la disminución de la capacidad antioxidante se produce un aumento del estrés oxidativo, reflejado en el aumento de los niveles de Glutati6n y de la relación entre las formas oxidada y reducida de éste.

- d. Los adenocarcinomas mamarios presentan una disminución de la capacidad antioxidante respecto al tejido mamario normal. Sin embargo, las dietas hiperlipídicas no ejercen un claro efecto sobre el estrés oxidativo de este tejido. Por otro lado, el análisis de los niveles hepáticos de lipofuscina sugiere el aumento de daño oxidativo en los grupos de dieta rica en PUFA n-6.
  - e. El estudio de otros parámetros de estrés oxidativo (F2-IsoP, 8-oxo-dG y ensayo Comet) no son concordantes con el resto de resultados, o que sugiere que dichos parámetros reflejan diferentes vías de estrés oxidativo y no han resultado ser unos buenos biomarcadores de daño genómico y peroxidación lipídica en este trabajo.
- 3.2. De la determinación del perfil de expresión de todo el genoma mediante *Microarrays* para la identificación de nuevos genes implicados en la carcinogénesis mamaria, y que hayan sido influenciados por las dietas hiperlipídicas respecto al grupo control:
- a. En glándula mamaria se observa un mayor número de genes diferencialmente expresados por efecto de las dietas hiperlipídicas respecto al tejido tumoral.
  - b. En glándula mamaria, después de un corto período de administración de las dietas hiperlipídicas, los genes diferencialmente expresados son principalmente específicos de cada grupo experimental, lo que sugiere un efecto agudo específico de cada dieta. En edades posteriores, ambas dietas modulan la expresión de una gran proporción de genes comunes entre dos o más grupos. En adenocarcinomas mamarios, los genes diferencialmente modificados son también fundamentalmente específicos de grupo.
  - c. En los adenocarcinomas mamarios, la ampliación del estudio de genes de interés confirmó el efecto de ambas dietas hiperlipídicas sobre genes del metabolismo (Scd y Fabp3) y Notch4. Por otro lado, los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de Cdkn2b, Smad1 y Jak2 fueron concordantes con el diferente grado de malignidad observado en los adenocarcinomas mamarios por efecto de ambas dietas.
  - d. Los genes diferencialmente modulados por efecto de ambas dietas hiperlipídicas se hallan fundamentalmente implicados en procesos metabólicos en glándula mamaria y adenocarcinomas.
  - e. En ambos tejidos, sólo la dieta rica en PUFA n-6, disminuye la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria y la apoptosis.



INTRODUCCIÓN  
MATERIAL & MÉTODOS  
RESULTADOS  
DISCUSIÓN  
CONCLUSIONES  
**BIBLIOGRAFÍA**



NOTA:

El número de las referencias se corresponde con el que posee cada una de ellas en la base de datos donde se encuentran informatizadas.

## Bibliografía

- [113] ESCRICH E, PRATS M, FERRER M, CASAMITJANA R, GAYA JM and RIVERA F. Determinación de receptores estrogénicos en patología mamaria humana: aspectos técnicos y su significado clínico. *Pharmatherapeutica*, 1980, 2:S102-S07.
- [439] HUGGINS C, GRAND LC and BRILLANTES FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature*, 1961, 189:204-07.
- [443] HUGGINS C, MORII S and GRAND LC. Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann. Surg.*, 1961, 154:315-18.
- [446] PECKHAM JC. Experimental oncology. En "The Laboratory Rat. Vol. II, Research Applications", BAKER HJ, LINDSEY JR, WEISBROTH SH, Academic Press, New York, 1980, 119-47.
- [447] ALTMAN NH and GOODMAN DG. Neoplastic diseases. En "The Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Diseases", BAKER HJ, LINDSEY JR, WEISBROTH SH, Academic Press, New York, 1979, 333-76.
- [451] RUSTIA M. Mammary carcinogenesis and prenatal hormonal imbalance: a new experimental model. 7<sup>th</sup> ICLASS Symp., Utrech, 1979. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1980.
- [453] ROSEN JM, RICHARDS DA, GUYETTE W and MATUSIK RJ. Steroid-hormone modulation of prolactin action in the rat mammary gland. En "Gene Regulation by Steroid Hormones", ROY AK and CLARK JH, Springer-Verlag, New York Inc., 1980, 58-77.
- [470] SASAKI G H and LEUNG B S. On the mechanism of hormone action in 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor. *Cancer*, 1975, 35:645- 51.
- [472] NAGASAWA H, YANAI R and TANIGUCHI H. Importance of mammary gland DNA synthesis on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res.*, 1976, 36:2223-26.
- [490] HSUEH AJ, PECK EJ JR and CLARK JH. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology*, 1976, 98:438-44.
- [493] TSENG L and GURPIDE E. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1975, 41:402-04.
- [494] MILGROM E, THI L, ATGER M and BAULIEU EE. Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248:6366-74.
- [566] ROWETT HGQ. Guías de Disección. III - La Rata (con notas sobre el ratón), colección Guías Urania, URANIA SA, Barcelona, 1976.
- [576] WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Organization histological typing of breast tumors - second edition. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1982, 78:806-16.
- [583] DELOUIS C. Histopathologie du sein: rôle des hormones dans l'élaboration de la maturation du tissu mammaire. En "Récepteurs hormonaux et pathologie mammaire". MARTIN PM, Medsi, París, 1980, 11-32.
- [586] NETTER FH. Anatomía y patología de la glándula mamaria. En "Sistema reproductor", tomo II, Colección Ciba de ilustraciones médicas, Salvat, 1982, 243-63.
- [798] ESCRICH E. Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamarios experimentales. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA, 1985.
- [807] WETSEL W C, RUTLEDGE A and ROGERS AE. Dietary corn oil does not alter plasma prolactin in rats. *Federation Proc.*, 1983, 42:526.
- [824] DESLYPERE JP, VERDONCK and VERMEULEN A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1985, 61:564-70.
- [827] ROGERS AE. Nutrition. En "The Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Diseases". BAKER HJ, LINDSEY JR and WEISBROTH SH. Academic Press, New York, 1979, 123-52.
- [839] IP C, YIP P and BERNARDIS LL. Role of prolactin in the promotion of dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors by dietary fat. *Cancer Res.*, 1980, 40(2):374-78.
- [840] BUTCHER RL, COLLINS WE and FUGO NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 1974, 94:1704-08.
- [855] KHON DF and BARTHOLD SW. Biology and diseases of rats. En "Laboratory Animal Medicine", FOX JG, COHEN BJ, LOEW FM, Academic Press, New York Inc., 1984, 91-122.
- [860] ARMSTRONG BK, McMICHAEL AJ and MacLENNAN R. Diet. En "Cancer epidemiology and prevention". SCHOTTENFELD D and FRAUMENI Jr JF. WB Saunders Company, Philadelphia, 1982, 419-32.
- [868] CARROLL KK and KHOR HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 1975, 10:308-53.

- [895] KIMATA K, SAKAKURA T, INAGUMA Y, KATO M and NISHIZUKA. Participation of two different mesenchymes in the developing mouse mammary gland: synthesis of basement membrane components by fat pad precursor cells. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1985, 89:243-57.
- [905] SUBCOMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION, COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, BOARD ON AGRICULTURE AND RENEWABLE RESOURCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of laboratory animals. En "Nutrient Requirements of Domestic Animals", NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Washington, DC, 1978, 6-35.
- [906] HATHWAY DE. Mechanisms of chemical carcinogenesis. BUTTERWORTHS, University Press, Cambridge, 1986.
- [918] WELSCH CW and AYLSWORTH CF. Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding high levels of dietary fat: a hormonal mechanism?. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1983, 70:215-21.
- [920] KRITCHEVSKI D, WEBER MM and KLURFELD DM. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1984, 44:3174-77.
- [921] HILLYARD LA and ABRAHAM S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. *Cancer Res.*, 1979, 39:4430-37.
- [922] CARROLL KK. Neutral fats and cancer. *Cancer Res.*, 1981, 41:3695-99.
- [927] AYLSWORTH CF, JONE C, TROSKO JE, MEITES J and WELSCH CW. Promotion of 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-induced mammary tumorigenesis by high dietary fat in the rat: possible role of intercellular communication. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 72:637-45.
- [934] SYLVESTER PW, RUSELL M, IP M and IP C. Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation, and endocrine function in rats. *Cancer Res.*, 1986, 46:757-62.
- [935] SPRATT JS, GREENBERG RA and HEUSER LS. Geometry, growth rates, and duration of cancer and carcinoma in situ of the breast before detection screening. *Cancer Res.*, 1986, 46:970-74.
- [943] KING MM, McCAY PB and RUSSO IH. Dietary fat may influence DMBA-initiated mammary gland carcinogenesis by modification of mammary gland development. En "Diet, Nutrition, and Cancer: From Basic Research to Policy Implications", ALAN R LISS Inc, New York, 1983, 61-90.
- [945] INNAMI S, YANG MG, MICKELSEN O and HAFS HD. The influence of high-fat diets on estrous cycles, sperm production and fertility of rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1973, 143:63-68.
- [976] MARTIN ME, VRANCKX R, BENASSAYAG C and NUNEZ EA. Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261:2954-59.
- [995] RUSSO J, SABY J, ISENBERG WM and RUSSO IH. Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, 59:435-45.
- [1023] CAMPBELL CS, SCHWARTZ NB and FIRLIT MG. The role of adrenal and ovarian steroids in the control of serum LH and FSH. *Endocrinology*, 1977, 101:162-72.
- [1029] NEMOTO N. Marked activation of benzo(a)pyrene to protein-binding forms in the presence of unsaturated fatty acids and heme-compounds. *Carcinogenesis*, 1986, 7:267-71.
- [1030] HOUDEBINE LM. Contrôle hormonal du développement et de l'activité de la glande mammaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1986, 26:523-41.
- [1046] IP C and IP MM. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12- dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 66:291-95.
- [1047] CAVE WT Jr and JURKOWSKI JJ. Dietary lipid effects on the growth membrane composition, and prolactin-binding capacity of rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 73:185-91.
- [1077] COHEN LA. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res.*, 1981, 41:3808-10.
- [1093] COHEN LA, CHOI K, NUMOTO S, REDDY S, BERKE B and WEISBURGER JH. Inhibition of chemically induced mammary carcinogenesis in rats by long-term exposure to butylated hydroxytoluene (BHT): interrelations among BHT concentration, carcinogen dose and diet. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 76:721-29.
- [1106] COHEN LA, THOMPSON DO, MAEURA Y, CHOI K, BLANK ME and ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer. I- Promoting effects of different dietary fats on N-Nitrosomethylurea- induced rat mammary tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 1:33-42.
- [1107] COHEN LA, THOMPSON DO, CHOI K, KARMALI RA and ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer: II- Modulation of serum and tumor lipid composition and tumor prostaglandins by different dietary fats: association with tumor incidence patterns. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 77:43-51.

## Bibliografia

- [1110] MAUVAIS-JARVIS P, KUTTENN F, GOMPEL A, MALET C and FOURNIER S. Interaction estradiol-progestérone au niveau des cellules mammaires humaines normales et pathologiques. *Ann. Endocrinol.-Paris*, 1986, 47:179-87.
- [1141] YOUNG S and HALLOWES RC. Tumours of the mammary gland. En "Pathology of Tumour in Laboratory Animals", Vol. I, Tumours of the rat. Part 1, 1973. TUROSOV, Lyon IARC, 31-74.
- [1221] UTERMOHLEN V. and TUCKER MAM. Possible effects of dietary n-6 series polyunsaturated fatty acids on the development of immune dysfunction and infection. *Proc. Nutr. Soc.*, 1986, 45:327-31.
- [1299] ESCRICH E. Mammary cancer model induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene: a good experimental tool for the study of tumour markers. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2:109-19.
- [1310] ADER R and FRIEDMAN SB. Plasma corticosterone response to environmental stimulation: effects of duration of stimulation and the 24-hour adrenocortical rhythm. *Neuroendocrinol.*, 1968, 3:378-86.
- [1347] GIDWITZ S, PESSIN JE, WEBER MJ, GLASER M and STORM DR. Effect of membrane phospholipid composition changes on adenylate cyclase activity in normal and rous-sarcoma-transformed chicken embryo fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 628:263-76.
- [1355] WELSCH CW. Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 45:S192-S202.
- [1358] IP C. Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 45:S218-S24.
- [1383] SOLOMONSON LP, LIEPKALNS VA and SPECTOR AA. Changes in (Na+K+)-ATPase activity of Ehrlich Ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry*, 1976, 15:892-97.
- [1387] Pathology of Laboratory Animals. Vol. I. K BENIRSCHKE, FM GARNER, TC JONES, Springer-Verlag, 1978.
- [1390] Pathology of Laboratory Animals. Vol. II. K BENIRSCHKE, FM GARNER, TC JONES, Springer-Verlag, 1978.
- [1425] DIPPLE A, MICHEJDA CJ and WEISBURGER EK. Metabolism of chemical carcinogens. En "Mechanism of Cellular Transformation by Carcinogenic Agents", GRUNBERGER D, GOFF S, Pergamon Press, 1987, 1-32.
- [1438] ESCRICH E. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2:197-206.
- [1442] WYNDER EL and HILL P. Prolactin, oestrogen, and lipids in breast fluid. *Lancet*, 1977, 2:840-42.
- [1486] IP C, IP M and SYLVESTER PW. Relevance of trans fatty acids and fish oil in animal tumorigenesis studies. En "Dietary Fat and Cancer", ALAN R LISS Inc, New York, 1986, 283-94.
- [1489] AYLSWORTH CF, WELSCH CW, KABARA JJ and TROSKO JE. Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat. *Lipids*, 1987, 22:445-54.
- [1518] SPECTOR AA and BURNS CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.*, 1987, 47:4529-37.
- [1520] RUSSO J and RUSSO IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 1987, 57:112-37.
- [1524] RUSSO J, TAY LK, CIOCCA DR and RUSSO IH. Molecular and cellular basis of the mammary gland susceptibility to carcinogenesis. *Environ. Health Persp.*, 1983, 49:185-99.
- [1560] LOMEIO F, KHOKHER MA and DANDONA P. Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog. Lipid Res.*, 1986, 25:511-13.
- [1572] SAINSBURY JRC, FARNDON JR, SHERBET GV and HARRIS AL. Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet*, 1985, 1:364-66.
- [1576] GELMANN P and LIPPMAN ME. Understanding the role of oncogenes in human breast cancer. En "Growth factors and oncogenes in breast cancer". SLUYSER M, Weinheim-New York, Ellis Horwood series in biomedicine, 1987, 29-43.
- [1585] SPORN MB and TODARO GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 1980, 303:878-80.
- [1659] SCHOTTENFELD D and FRAUMENI JF. *Cancer Epidemiology and Prevention.*, W B Saunders Company, Philadelphia, 1982.
- [1660] ARMSTRONG B and DOLL R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer*, 1975, 15:617-31.
- [1666] HILL MJ, GODDARD P and WILLIAMS REO. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet*, 1971, 2:472-73.

- [1669] CORMIER EM, WOLF MF and JORDAN VC. Decrease in estradiol-stimulated progesterone receptor production in MCF-7 cells by epidermal growth factor and possible clinical implication for paracrine-regulated breast cancer growth. *Cancer Res.*, 1989, 49:576-89.
- [1674] DOMENECH JH. Estrategia para el análisis de relaciones entre más de dos caracteres cualitativos. En "Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores", DOMENECH JM, Herder, Barcelona, 1977, 216-24.
- [1678] ESCRICH E. Lípidos de la dieta y cáncer de mama. Tesis doctoral, Barcelona, 1990.
- [1756] MOROCO JR, SOLT DB and POLVERINI PJ. Sequential loss of supressor genes for three specific functions during in vivo carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 1990, 63:298-306.
- [1829] ESCRICH E and SEGURA R. Factores de la dieta y cáncer de mama. *Rev. Senología y Patol. Mam.*, 1991, 4:86-96.
- [1854] FERNANDES G and VENKATRAMAN JT. Modulation of breast cancer growth in nude mice by omega 3 lipids. *World Rev. Nutr. Diet*, 1991, 66:488-503.
- [1870] SUNDERLAND MC and McGUIRE WL. Hormones and breast cancer. *Trends Endocrin. Met.*, 1991, 2:72-76.
- [1881] CANTLEY LC, AUGER KR, CARPENTER C, DUCKWORTH B, GRAZIANI A, KAPPELLER R, SOLTOFF S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 1991, 64(2):281-302.
- [1937] RONAI Z, LAU Y and COHEN LA. Dietary n-3 fatty acids do not affect induction of Ha-ras mutations in mammary glands of NMU-treated rats. *Mol. Carcinogen.*, 1991, 4:120-28.
- [1942] BIRT DF, KRIS ES, CHOE M, PELLING JC. Dietary energy and fat effects on tumor promotion. *Cancer Res.*, 1992, 52:S2035-S39.
- [1943] WELSCH CW. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.*, 1992, 52(7 Suppl):2040s-48s.
- [1948] VAN DE VIJVER MJ and NUSSE R. The molecular biology of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1072:33-50.
- [1959] CAVE WT. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J.*, 1991, 5:2160-66.
- [1962] FREEDMAN LS, CLIFFORD C and MESSINA M. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. *Cancer Res.*, 1990, 50:5710-19.
- [1975] HUNTER T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 1991, 64:249-70.
- [2045] CARROLL KK. Dietary fat and breast cancer. *Lipids*, 1992, 27:793-97.
- [2050] WEBER PC. n-3 fatty acids and human disease. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1990, 50:14-19.
- [2054] CHOE M, KRIS ES, LUTHRA R, COPENHAVER J, PELLING JC, DONNELLY TE, BIRT DF. Protein kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from Sencar mice fed high fat diets. *J. Nutr.*, 1992, 122:2322-29.
- [2085] DEVRIES CEE and VANNOORDEN CJF. Effects of dietary fatty acid composition on tumor growth and metastasis. *Anticancer Res.*, 1992, 12:1513-22.
- [2137] SUMIDA C, GRABER R and NUNEZ E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 1993, 48:117-22.
- [2206] PANSINI F, BONACCORSI G, GENOVESI F, FOLEGATTI MR, BAGNI B, BERGAMINI CM and MOLLICA G. Influence of estrogens on serum free fatty acid levels in women. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1990, 71:1387-89.
- [2227] HIMENO Y, ENGELMAN RW and GOOD RA. Influence of calorie restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:5497-01.
- [2245] NAKAYAMA M, RAN JU H, SUGANO M, HIROSE N, UEKI T, DOI F and EYNARD AR. Effect of dietary fat and cholesterol on dimethylbenz( $\alpha$ )-anthracene-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Anticancer Res.*, 1993, 13:691-698.
- [2260] HAEFFNER EW. Diacylglycerol: formation and function in phospholipid-mediated signal transduction. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 105C:337-345.
- [2264] CLANDININ MT, CHEEMA S, FIELD CJ, GARG ML, VENKATRAMAN J and CLANDININ TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.*, 1991, 5:2761-68.
- [2265] MIZUKAMI Y, NONOMURA A, NOGUCHI M, TANIYA T, THOMAS MA, NAKAMURA S and MIYAZAKI I. Effects of high and low dietary fat and indomethacin on tumour growth, hormone receptor status and growth factor expression in DMBA-induced rat breast cancer. *Int. J. Tissue React.*, 1992, 14:269-76.
- [2272] TILLOTSON JK, DARZYNKIEWICZ Z, COHEN LA and RONAI Z. Effects of linoleic acid on mammary tumor cell proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int. J. Oncol.*, 1993, 3:81-87.

## Bibliografía

- [2276] MERRILL AH and SCHROEDER JJ. Lipid modulation of cell function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1993, 13:539-59.
- [2289] ROSE DP, HATALA MA, CONNOLLY JM and RAYBURN J. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res.*, 1993, 53:4686-90.
- [2349] SCHUCHARD M, LANDERS JP, PUNKAY SANDHU N and SPELSBERG TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr. Rev.*, 1993, 14:659-69.
- [2363] HOWELL A, De FRIEND D and ANDERSON E. Mecanismos de respuesta y resistencia a la terapia endocrina en el cáncer de mama y desarrollo de nuevos tratamientos. En "Revisiones: Cáncer Endocrino-Dependiente", VHT JAMES, The Journal of Endocrinology Ltd, 1993, 43:7-26.
- [2388] SINGER B and KUSMIEREK JT. Chemical mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1982, 52:655-93.
- [2393] RUSSO J, CALAF G, SOHI N, TAHIN Q, ZHANG PL, ALVARADO ME, ESTRADA S and RUSSO IH. Critical steps in breast carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1993, 698:1-20.
- [2406] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hCG and inhibin in breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 1994, 4:297-306.
- [2415] CLARKE SD and JUMP DB. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 1993, 32:139-49.
- [2421] ZEILLINGER E, KURY F, SPEISER P, SLIUTZ G, CZERWENKA K and KUBISTA E. EGF-R and steroid receptors in breast cancer: a comparison with tumor grading, tumor size, lymph node involvement, and age. *Clin. Biochem.*, 1993, 26:221-27.
- [2422] CLARKE SD. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.*, 1994, 14:83-98.
- [2428] KLIJN JGM, BERNS PMJJ, BONTENBAL M and FOEKENS JA. Growth factors. Clinical implications in breast cancer. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1993, 698:85-101.
- [2430] GRABER R, SUMIDA CH and NUNEZ EA. Fatty acids and cell signal transduction. *J. Lipid Med. Cell Sign.*, 1994, 9:91-116.
- [2444] BIÈCHE I, CHAMPÈME MH, LIDEREAU R. A tumor suppressor gene on chromosome 1p32-pter controls the amplification of MYC family genes in breast cancer. *Cancer Res.*, 1994, 54(16):4274-76.
- [2493] HARTWELL L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 1992, 71:543-46.
- [2522] MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, 266:66-71.
- [2542] CLARKE SD and ABRAHAM S. Gene expression: nutrient control of pre- and post-transcriptional events. *FASEB J.*, 1992, 6:3146-52.
- [2545] BLAKE WL and CLARKE SD. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J. Nutr.*, 1990, 12:1727-29.
- [2546] ARMSTRONG MK, BLAKE WL and CLARKE SD. Arachidonic acid suppression of fatty acid synthase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 1991, 177:1056-61.
- [2547] JUMP DB, CLARKE SD, MacDOUGALD O and THELEN A. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:8454-58.
- [2549] KIM KH and TAE HJ. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.*, 1994, 124:1273S-83S.
- [2556] DIVECHA N and IRVINE RF. Phospholipid signaling. *Cell*, 1995, 80:269-78.
- [2567] ESCRICH E, SOLANAS M and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I-diet definition. *Int. J. In Vivo Res.*, 1994, 8:1099-106.
- [2568] ESCRICH E, SOLANAS M, RUIZ DE VILLA MC, RIBALTA T, MUNTANE J and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *Int. J. In Vivo Res.*, 1994, 8:1107-12.
- [2571] SEKIMIZU K. Interactions between DNA replication-related proteins and phospholipid vesicles in vitro. *Chem. Phys. Lipids*, 1994, 73:223-30.
- [2572] KINNUNEN PKJ, JUKKA AK, LEHTONEN JYA, RYTOMAA MA and MUSTONEN P. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surface. *Chem. Phys. Lipids*, 1994, 73:181-207.
- [2586] WOOSTER R and STRATTON MR. Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. *Trends Genet.*, 1995, 11:3-5.
- [2606] SAGER R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 1989, 246(4936):1406-12.

- [2608] HUNTER DJ and WILLET WC. Diet, body build, and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.*, 1994, 14:393-418.
- [2612] BURN P. Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 1988, 13:79-83.
- [2613] NIGGLI V and BURGER MM. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Membrane Biol.*, 1987, 100:97-121.
- [2614] GRIMARD R, TANCREDE P and GICQUARD C. Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 190:1017-22.
- [2617] LANDSCHULTZ KT, KAESTNER KH and LANE MD. Regulation of mouse liver stearoyl-CoA desaturase gene expression by dietary carbohydrate and fat. *FASEB J.*, 1991, 5:A1649.
- [2631] BIRKENFELD A and KASE NG. Functional anatomy and physiology of the female breast. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 1994, 21:433-44.
- [2632] KELLER-WOOD M and BLAND KI. Breast physiology in normal, lactating and diseased states. En "The Breast. Comprehensive Managements of Benign and Malignant Diseases". BLAND KI and COPELAND EM, 1991, 36-40.
- [2633] IMAGAWA W, YANG J, GUZMAN R and NANDI S. Control of mammary gland development. En "The Physiology of Reproduction", E KNOBIL, JD NEIL, Raven Press, Ltd., New York, 1994, 1033-63.
- [2636] YEN SSC. Prolactina en la reproducción humana. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 382-413.
- [2637] CATT KJ and DUFAU ML. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acciones. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 126-77.
- [2638] YEN SCC. Ciclo menstrual humano: regulación neuroendocrina. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 296-332.
- [2639] SANTEN RJ. Hipogonadismo humano. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 765-820.
- [2642] ESCRICH E, MUNTANE J, RIBALTA T, COLOM J, SOLANAS M and SEGURA R. Efectos de una dieta hiperlipídica sobre la carcinogénesis mamaria experimental: contenido y tipo de tumores. *Neoplasia*, 1992, 9:54-56.
- [2643] APARICIO CANO J, CENDEJAS MM and LARRODERA LOPEZ L. Determinación de receptores de estrógenos y progesterona en 504 muestras de carcinoma mamario. *Quim. Clin.*, 1995, 14:63-68.
- [2645] WEISZ A and BRESCIANI F. Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Critical Rev. Oncogenesis*, 1993, 4:361-88.
- [2648] SAMBROOK J, FRITSCH EF and MANIATIS T. En "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [2789] EXTON JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.*, 1994, 56:349-69.
- [2834] CLINTON SK, LI PS, MULLOY AL, IMREY PB, NANDKUMAR S and VISEK WJ. The combined effects of dietary fat and estrogen on survival, 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-induced breast cancer and prolactin metabolism in rats. *J. Nutr.*, 1995, 125:1192-1204.
- [2845] GAYTHER SA, WARREN W, MAZOYER S *et al.* Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat. Genet.*, 1995, 11:428-33.
- [2846] COX LA, CHEN G and LEE EY-HP. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. *Breast Cancer Res. Tr.*, 1994, 32:19-38.
- [2949] IP C, BRIGGS SP, HAEGELE AD, THOMPSON HJ, STORKSON J and SCIMECA JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, 1996, 17:1045-50.
- [2952] RUSSO J and RUSSO IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1996, 39:7-20.
- [2955] SINGH J, HAMID R and REDDY BS. Dietary fat and colon cancer: modulating effect of types and amount of dietary fat on ras-p21 function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res.*, 1997, 57:253-58.
- [2984] DAVIS CD and SNYDERWINE EG. Analysis of EGFR, TGF- $\alpha$ , neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis*, 1995, 16:3087-92.
- [3013] CAVE WT. Dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fats and breast cancer. *Nutr.*, 1996, 12:S39-S42.
- [3018] GERBER M. Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. *Cancer Let.*, 1997, 114:91-92.
- [3060] SUNDRAM K, KHOR HT, ONG A and PATHMANATHAN R. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene. *Cancer Res.*, 1989, 49:1447-51.

## Bibliografia

- [3114] ROSE DP. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am. J. Nutr.*, 1997, 66:1513S-22S.
- [3122] RUSSO IH and RUSSO J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *J. Natl. Inst. Env. Health Sci.*, 1996, 9:938-67.
- [3123] REID SE, MURTHY MS, KAUFMAN M and SCANLON EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br. J. Surg.*, 1996, 83:1037-1046.
- [3144] HARRIS, CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Environ Health Prospect.*, 1996, 104:435-39.
- [3165] RUSSO J and RUSSO IH. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)*, 1997, 57:S81-S91.
- [3185] CAVE WT Jr. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatm.*, 1997, 46:239-46.
- [3195] THOMPSON H, ZHU Z, BANNI S, DARCY K, LOFTUS T and IP C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implications for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.*, 1997, 57:5067-72.
- [3198] BRENNER RR. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 1981, 20:41-47.
- [3205] IP C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 66:S15235-S95.
- [3229] VISIOLI F and GALLI C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agricult. Food Chem.*, 1998, 10:4292-96.
- [3321] WREN BG. Do progestagens reduce the risk of breast cancer? A review of the evidence. *Menopause*, 1996, 3:4-12.
- [3326] IBRAHIM NK and HORTOBAGYI GN. New antiestrogens in breast cancer: a review. *Breast J.*, 1998, 4:213-29.
- [3332] GRAHAM JD and CLARKE CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.*, 1997, 18:502-19.
- [3334] ROSEN JM, HUMPHREYS R, KRNACIK S, JUO P and RAUGHT B. The regulation of mammary gland development by hormones, growth factors, and oncogenes. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1994, 387:95-111.
- [3338] FAY MP, FREEDMAN LS, CLIFFORD CK and MIDTHUNE DN. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.*, 1997, 57(18):3979-88.
- [3339] WATSON WH, CAI J and JONES DP. Diet and apoptosis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20: 485-505.
- [3341] HILAKIVI-CLARKE L, CLARKE R, ONOJAFE I, RAYGADA M, CHO E and LIPPMAN M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94(17):9372-77.
- [3355] DAVIDSON LA, LUPTON JR, JIANG JH and CHAPKINS RS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis*, 1999, 5:785-91.
- [3370] SRIVASTAVA P, RUSSO J, MGBONYEBI OP and RUSSO IH. Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells. *Anticancer Res.*, 1998, 18:4003-10.
- [3372] BENAUD C, DICKSON RB and THOMPSON EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, 50:97-116.
- [3403] GRANDIEN K, BERKENSTAM A and GUSTAFSSON JA. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1997, 29:1343-69.
- [3405] IWASE H, OMOTO Y, IWATA H, HARA Y, ANDO Y and KOBAYASHI S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology*, 1998, 55:S11-S16.
- [3412] BORRÁS JM, BORRÁS J, VILADIU P and BOSCH FX. Epidemiologia i prevenció del càncer a Catalunya (1975-1992). Institut Català d'oncologia, 1ª edició, 1997.
- [3421] WYNDER EL, COHEN LA, MUSCAT JE, WINTERS B, DWYER JT and BLACKBURN G. Breast cancer: weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, 89:766-75.
- [3443] MOYA-CAMARENA SY, VANDELHEUVEL JP and BELURY MA. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferator in Sprague-Dawley rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1436:331-42.
- [3454] ROBERTS-THOMSON SJ and SNYDERWINE EG. mRNA differential display of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-*b*]pyridine-induced rat mammary gland tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, 51(2):99-107.

- [3503] RUSSO H, GUSTERSON BA, ROGERS AE, RUSSO IH, WELLINGS SR and ZWIETEN J. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. investing.*, 1990, 3:244-78.
- [3504] CAKDER PC. Dietary fatty acids and the immune system. *Lipids*, 1999, 34:S137-S40.
- [3535] VACARESSE N, LAJOIE-MAZENC I, AUGÉ N, SUC I, FRISACH MF, SALVAYRE R and NEGRE-SALVAYRE A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ. Res.*, 1999, 85:892-99.
- [3555] KERSTEN S, SEYDOUX J, PETERS JM, GONZALEZ FJ, DESVERGNE B and WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.*, 1999, 103:1489-98.
- [3564] BARTOLÍ R, FERNÁNDEZ-BAÑARES F, NAVARRO E, CASTELLÀ E, MANÉ J, ALVÁREZ M, PASTOR C, CABRÉ E and GASSULL MA. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. *Gut*, 2000, 46:191-99.
- [3567] BANNI S, ANGIONI E, CASU V, MELIS MP, CARTA G, CORONGIU FP, THOMPSON H and IP C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*, 1999, 6:1019-24.
- [3568] BARTSCH H, NAIR J and OWEN RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999, 20:2209-2218.
- [3569] ROSE DP and CONNOLLY JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.*, 1990, 50:7139-44
- [3573] WEISBURGER JH. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1997,97:S16-S23.
- [3581] SNYDERWINE EG and DAVIS CD. Proliferation, development and DNA adduct levels in the mammary gland of rats given 2-amino-1-methyl-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine and a high-fat diet. *Carcinogenesis*, 1998, 19:1209-15.
- [3588] HILAKIVI-CLARKE L, STOICA A, RAYGADA M and MARTIN MB. Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring. *Cancer Res.*, 1998, 58(4):654-60.
- [3615] WOUTERSEN RA, APPEL MJ, GARDEREN-HOETMER A and VW WIJNANDS M. Dietary fat and carcinogenesis. *Mut. Res.*, 1999, 443:111-27.
- [3616] HAMID R and SING J. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and 2 in NMU-induced rat mammary tumors. *Intl. J. Oncol.*, 1999, 14:523-28.
- [3619] RAO C, NEWMARK H and REDDY B. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 1998, 2:287-90.
- [3620] TJ SMITH, GY YANG, DN SERIL, J LIAO, AND S KIM. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 1998 19: 703-06.
- [3621] GIOVANNINI C, STRAFACE E, MODESTI D, CONI E, CANTAFORA A, DE VINCENZI M, MALORNI W and MASELLA R. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 1999, 129(7):1269-77.
- [3672] SOLANAS M, MORAL R, COLOMER R and ESCRICH E. Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J. Women's Cancer*, 2000, 2:67-72.
- [3673] KRITCHEVSKY D. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Toxicol. Sciences*, 1999, 52:13-16.
- [3695] DANIEL LW, SCIORRA VA and GHOSH S. Phospholipase D, tumor promoters, proliferation and prostaglandins. *Bioch. Biophys. Acta*, 1999, 1439:265-76.
- [3701] UCHIDA N, OKAMURA S-I, NAGAMAGHI Y and YAMASHITA S. Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997, 123:280-85.
- [3771] NEWMARK HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999, 889:193-203.
- [3798] SUPOWIT SC and ROSEN JM. Hormonal induction of casein gene expression limited to a small subpopulation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor cells. *Cancer Res.*, 1982, 42:1355-60.
- [3824] GLASGOW WC, HUI R, EVERHART AL, JAYAWICKREME SP, ANGERMAN-STEWART J, HAN BB and ELING TE. The linoleic acid metabolite, (13S)-hydroperoxyoctadecadienoic acid, augments the epidermal growth factor receptor signalling pathway by attenuation of receptor dephosphorylation. Differential response in Syrian hamster embryo tumor suppressor phenotypes. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:19269-19276.
- [3840] LEE MM and LIN SS. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:221-48.
- [3844] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.*, 2000, 83:S59-S66.

## Bibliografía

- [3852] COHEN LA, EPSTEIN M, PITTMAN B and RIVENSON A. The influence of different varieties of olive oil on N-methylnitrosourea(NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.*, 2000, 20:2307-12.
- [3854] OWEN RW, MIER W, GIACOSA A, HULL WE, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38:647-59.
- [3857] KACHHAP SK, DANGE P and NATH GHOSH S. Effect of  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Let.*, 2000, 154:115-20.
- [3860] ASSMANN G, DE BACKER G, BAGNARA S, BETTERIDGE J, CREPALDI G, FERNANDEZ-CRUZ A, GODTFREDSSEN J, JACOTOT B, PAOLETTI R, RENAUD S, RICCI G, ROCHA E, TRAUTWEIN E, URBINATI GC, VARELA G and WILLIAMS C. Olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. *Br. J. Nurs.*, 1997, 6:675-77.
- [3861] LA VECCHIA C, NEGRI E, FRANCESCHI S, DECARLI A, GIACOSA A and LIPWORTH L. Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy). *Cancer Causes Control*, 1995, 6:545-50.
- [3864] MARTIN-MORENO JM. The role of olive oil in lowering cancer risk: Is this real gold or simply pinchbeck?. *J. Epidemiol. Commun. Health*, 2000, 54(10): 726-27.
- [3908] AREA DE EPIDEMIOLOGÍA AMBIENTAL Y CÁNCER. Mortalidad por cáncer en España, 1998. Centro Nacional de Epidemiología. <http://193.146.50.130/cancer/mort98.txt>.
- [3923] WEISS L and GREEP RD. La glándula mamaria. En "Histología". Ed. "El Ateneo", Barcelona, 1982, 4ª ed., 822-45.
- [3924] ROSEN PP and OBERMAN HA. Anatomy. En "Tumors of the mammary gland". ROSAI J and SOBIN LH, AFIP, Washington DC, 1992, 11-13.
- [3929] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 2001, 131:1129-32.
- [3935] PINHEIRO JC and BATES DM. Mixed-effects models in S and S-Plus. *Statistics and Computing Series*, Ed. Springer-Verlag, 2000.
- [3947] ESCRICH E, SOLANAS M, SOLER M, RUIZ DE VILLA MC, SÁNCHEZ JA and SEGURA R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.*, 2001, 12:536-49.
- [3950] ESCRICH E. Endocrine aspects of breast cancer. En "Senology", CARDOSO J, Ed. Monduzzi Editore. Págs. 599-603. Bologna (Italy), 1998.
- [3957] SCHORR K, LI M, KRAJEWSKI S, REED JC and FURTH PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1999, 4:153-64.
- [3965] RUSSO J, AO X, GRILL C and RUSSO IH. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1999, 53:217-27.
- [3966] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1998, 3:49-61.
- [3973] HANAHAN D and WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100:57-70.
- [3977] KARMALI RA, DONNER A, GOBEL S and SHIMAMURA T. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on 7,12 dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.*, 1989, 9:1161-67.
- [3980] BÉGIN ME, ELLS G and HORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, 80:188-94.
- [3982] KENNY FS, GEE JM, NICHOLSON RI, ELLIS IO, MORRIS TM, WATSON SA, BRYCE RP and ROBERTSON JF. Effect of dietary GLA+/-tamoxifen on the growth, ER expression and fatty acid profile of ER positive human breast cancer xenografts. *Int J. Cancer*, 2001, 92:342-47.
- [3983] JIANG WG, HISCOX S, HORROBIN DF, BRYCE RP and MANSEL RE. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 237:639-44.
- [4007] GUTHRIE N and CARROLL KK. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog. Lipid Res.*, 1999, 38:261-71.
- [4033] SCHEDIN P, MITRENGA T and KAECK M. Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2000, 5(2):211-25.
- [4047] IZZOTTI A, CAMOIRANO A, CARTIGLIA C, GRUBBS CJ, LUBET RA, KELLOFF GJ and De FLORA S. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 1999, 59:4285-90.

- [4048] TANG MS, VULIMIRI SV, VIAJE A, CHEN JX, BILOLIKAR DS, MORRIS RJ, HARVEY RG, SLAGA T and DiGIOVANNI J. Both (+/-)syn- and (+/-)anti-7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-3,4-diol-1,2-epoxides initiate tumors in mouse skin that possess -CAA- to -CTA- mutations at codon 61 of c-H-ras. *Cancer Res.*, 2000, 60:5688-95.
- [4061] EVAN GI and VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, 411:342-48.
- [4080] CHAKRAVARTI D, PELLING JC, CAVALIERI EL and ROGAN EG. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92:10422-26.
- [4081] HOLLANDER MC, KOVALSKY O, SALVADOR JM, KIM KE, PATTERSON AD, HAINES DC and FORNACE AJ. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer Res.*, 2001, 61:2487-91.
- [4093] KUMAR R, VADLAMUDI RK and ADAM L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-rel. Cancer*, 2000, 7:257-69.
- [4155] HWANG D. Fatty acids and immune responses - A new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:431-56.
- [4175] DEVANESAN PD, RAMAKRISHNA NV, PADMAVATHI NS, HIGGINBOTHAM S, ROGAN EG, CAVALIERI EL, MARSCH GA, JANKOWIAK R and SMALL GJ. Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, 6:364-71.
- [4176] RAMAKRISHNA NV, DEVANESAN PD, ROGAN EG, CAVALIERI EL, JEONG H, JANKOWIAK R and SMALL GJ. Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, 5:220-26.
- [4177] CAVALIERI EL and ROGAN EG. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 1995, 25:677-88.
- [4178] RAHMAN KM, SUGIE S, TANAKA T, MORI H and REDDY BS. Effect of types and amount of dietary fat during the initiation phase of hepatocarcinogenesis. *Nutr. Cancer*, 2001, 39:220-25.
- [4198] PRIOR IA and HANCOCK JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J. Cell Sci.*, 2001, 114: 1603-08.
- [4202] SOLANAS M, MORAL R and ESCRICH E. Mecanismos de activación de proto-oncogenes. Papel de la sobreexpresión génica en cáncer de mama. *Oncología*, 2002, 25:243-57.
- [4206] COSTA I, ESQUIUS J, SOLANAS M, MORAL R and ESCRICH E. Histopathologic characteristics of chemically-induced mammary adenocarcinomas in rats fed diets high in (n-6) polyunsaturated lipids. *Virchows Archiv.*, 2001, 439:310-11.
- [4216] SIMONS K and IKONEN E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387:569-72.
- [4264] COSTA I, SOLANAS M and ESCRICH E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2002, 126(8): 915-27.
- [4300] STARK AH and MADAR Z. Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nut. Reviews*, 2002, 60(6): 170-76.
- [4303] SOLANAS M, HURTADO A, COSTA I, MORAL R, MENÉNDEZ JA, COLOMER R and ESCRICH E. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int. J. Oncol.*, 2002, 21(4):745-53.
- [4324] STOLL BA. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *British J. Nut.*, 2002, 87:193-98.
- [4325] BERNARD-GALLON DJ, VISSAC-SABATIER C, ANTOINE-VINCENT D, RIO PG, MAURIZIS JC, FSTIER P and BIGNON YJ. Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *Br. J. Nut.*, 2002, 87: 281-89.
- [4333] MORENO V, GONZÁLEZ JR, SOLER M, BOSCH FX, KOGEVINAS M and BORRÀS JM. Estimación de la incidencia de cáncer en España: período 1993-1996. *Gaceta Sanitaria*, 2001, 15:380-88.
- [4349] WILLET WC. Diet and cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidem., Biomarkers Prev.*, 2001, 10:3-8.
- [4350] WILLET WC. Diet and breast cancer. *J. Internal Med.*, 2001, 249:395-411.
- [4351] KUSHI L and GIOVANNUCCI E. Dietary fat and cancer. *Am. J. Med.*, 2002, 113(9B): 63-70S.
- [4353] TAVANI A, PELUCCHI C, PARPINEL M, NEGRI E, FRANCESCHI S, LEVI F and LA VECCHIA C. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. *Int. J. Cancer*, 2003, 105:113-16.
- [4393] MORAL R, SOLANAS M, GARCÍA G, COLOMER R and ESCRICH E. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol. Rep.*, 2003, 10:1417-24.

- [4399] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer*, 2000, 36(10):1235-47.
- [4401] JIANG WG, HISCOX S, HALLET MB, HORROBIN DF, MANSEL RE and PUNTIS MC. Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res.*, 1995, 55:5043-48.
- [4403] BIRT DF, HENDRICH S and WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 2001, 90(2-3):157-77.
- [4404] YANG CS, LANDAU JM, HUANG MT and NEWMARK HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, 2001, 21:381-406.
- [4468] FUTREAL PA, COIN L, MARSHALL M, DOWN T, HUBBARD T, WOOSTER R, RAHMAN N and STRATTON MR. A census of human cancer genes. *Nature Reviews*, 2004, 4:177-83.
- [4472] BOTHA JL, BRAY F, SANKILA R and PARKIN DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur. J. Cancer*, 2003, 39:1718-29.
- [4473] SANT M, ALLEMANI C, BERRINO F *et al.* (21 authors). Breast carcinoma survival in Europe and the United States. A population-based study. *Cancer*, 2004, 100(4):715-22.
- [4505] POWER KA and THOMPSON LU. Ligand-induced regulation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003, 81:209-21.
- [4506] MAGEE PJ and ROWLAND IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British J. Nut.*, 2004, 91:513-31.
- [4534] NATHANSON KN, WOOSTER R and WEBER BL. Breast Cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Med.*, 2001, 7(5):552-56.
- [4537] THOMPSON HJ and SINGH M. Rat models of premalignant breast disease. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2000, 5:409-20.
- [4538] IP MM, MASSO-WELCH PA and IP C. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: Role of the stroma and the epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2003, 8:103-18.
- [4539] ROCK CL. Diet and breast cancer: Can dietary factors influence survival? *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.*, 2003, 8(1):119-32.
- [4540] KAPUT J and RODRÍGUEZ RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol. Genomics*, 2004, 16:166-77.
- [4541] JUMP DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences*, 2004, 41(1):41-78.
- [4542] REYES N, REYES I, TIWARI R and GELIEBTER J. Effect on linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.*, 2004, 209:25-35.
- [4543] KHAN SA and HEUVEL JPV. Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *J. Nut. Biochem.*, 2003, 14:554-67.
- [4546] LARSSON S, KUMLIN M, INGELMAN-SUNDBERG M and WOLK A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79:935-45.
- [4547] STULNIG TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2003, 132:310-21.
- [4577] ANDERSON E and CLARKE RB. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2004, 9(1):3-13.
- [4593] PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LONNING PE, BORRESEN-DALE A-L, BROWN PO and BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406:747-52.
- [4594] SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R *et al.* (17 authors). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *P.N.A.S.*, 2001, 98(19):10869-74.
- [4595] KEEN JC and DAVIDSON NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 2003, 97:825-33.
- [4614] MA DWL, SEO J, DAVIDSON LA, CALLAWAY ES, FAN YY, LUPTON JR and CHAPKIN RS. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J.*, 2004, 18:1040-42.
- [4615] BROWN DA and LONDON E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:17221-24.
- [4623] NAROD SA and FOULKES WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews*, 2004, 4:665-76.

- [4631] OCHOA-HERRERA JJ, HUERTAS JR, QUILES JL and MATAIX J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J. Nut. Biochem.*, 2001, 12:357-64.
- [4633] QUILES JL, OCHOA JJ, RAMIREZ-TORTOSA C, BATTINO M, HUERTAS JR, MARTIN Y and MATAIX J. Dietary fat type (virgin olive vs sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Exp. Gerontol.*, 2004, 39(8):1189-98.
- [4634] LLOR X, PONS E, ROCA A, ALVAREZ M, MAÑÉ J, FERNÁNDEZ-BAÑARES F and GASSULL MA. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin. Nutr.*, 2003; 22:71-79.
- [4647] BRAY F, McCARRON P and PARKIN DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.*, 2004, 6:229-39.
- [4653] HARVEY PW and DARBRE P. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24:167-76.
- [4662] ADLERCREUTZ H. Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 83:113-18.
- [4680] CAVALIERI E, FRENKEL K, LIEHR JG, ROGAN E and ROY D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 2000, 27:75-93.
- [4713] MITRA AK, FARUQUE FS and AVIS AL. Breast cancer and environmental risks: Where is the link? *J. Environm. Health*, 2004, 66:24-32.
- [4716] WATSON CS, GAMETCHU B, NORFLEET AM, CAMPBELL CH and THOMAS ML. Rapid, nongenomic actions of estrogens. *Women Cancer*, 1998, 1(1):21-28.
- [4718] WATSON CS, CAMPBELL CH and GAMETCHU B. The dynamic and elusive membrane estrogen receptor- $\alpha$ . *Steroids*, 2002, 67:429-37.
- [4719] BULAYEVA NN and WATSON CS. Xenostrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signalling pathways. *Environm. Health Perspect.*, 2004, 112:1481-87.
- [4722] PARKER BS, ARGANI P, COOK BP, LIANGFENG H, CHARTRAND SD, ZHANG M, SAHA S, BARDELLI A, JIANG Y, MARTIN TBS, NACHT M, TEICHER BA, KLINGER KW, SUKUMAR S and MADDEN SL. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.*, 2004, 64:7857-66.
- [4723] GUO W and GIANCOTTI FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, 5(10):816-26.
- [4735] ESCRICH E, MORAL R, GARCÍA G, COSTA I, SÁNCHEZ JA and SOLANAS M. Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol. Carcinog.*, 2004, 40:73-78.
- [4736] COSTA I, MORAL R, SOLANAS M and ESCRICH E. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 86:225-35.
- [4737] MORAL R, SOLANAS M, MANZANARES EM, HARO D and ESCRICH E. Influence of DMBA-induced mammary cancer on the liver CPT I, mit HMG-CoA synthase and PPAR $\alpha$  mRNA expression in rats fed low or high corn oil diet. *Int. J. Mol. Med.*, 2004, 14:283-87.
- [4743] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, WÜRTELE G, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Olive-Oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet*, 2000, 1:107-12.
- [4744] MA DWL, SEO J, SWITZER KC, FAN YY, McMURRAY DN, LUPTON JR and CHAPKIN RS. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15:700-06.
- [4765] MORENO JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.*, 2003, 35:1073-81.
- [4802] OWEN RH, HAUBNER R, WÜRTELE G, HULL WE, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2004, 13:319-26.
- [4804] DOWHAN W, MILEYKOVSKAYA E and BOGDANOV M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches, 2004, 1666:19-39.
- [4808] MATAIX J, QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M and MAÑAS M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, 24(4):511-21.
- [4811] SOLANAS M, ESCRICH E, ROUZAUT A, COSTA I, MARTÍNEZ A and NOTARIO V. Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene. *Mol. Carcinog.*, 2002, 33:219-27.

## Bibliografia

- [4816] TOMASSONI ML, AMORI D and MAGNI MV. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 258:476-81.
- [4818] HULBERT AJ, TURNER N, STORLIEN LH and ELSE PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 2005, 80: 155-69.
- [4822] HULBERG AJ and ELSE PL. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Ann. Rev. Physiol.*, 2000, 62: 207-35.
- [4824] HOLDER JW, ELMORE E and BARRET JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.*, 1993, 53:3475-85.
- [4837] KOSOY G, MADAR Z, BEN-HUR H, GAL R, STARK A, COHEN O, ZUSMAN I. Transplacental effect of a 15% olive-oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tumors of rat offspring. *Oncol. Rep.*, 2001, 8:1045-49.
- [4861] ALBI E and VIOLA MAGNI, MP. The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell*, 2004, 96: 657-67.
- [4865] HU X, JUNEJA SC, MAIHLE NJ and CLEARY MP. Leptin - a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 94:1704-11.
- [4883] VISIOLI F, GRANDE S, BOGANI P and GALLI C. The role of antioxidants in the mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2004, 13: 337-43.
- [4895] REYES N, IATROPOULOS M, MITTELMAN A and GELIEBTER J. Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2002, 11Suppl 2:S37-S42.
- [4902] WU B, IWAKIRI R, OOTANI A, TSUNADA S, FUJISE T, SAKATA Y, SAKATA H, TODA S and FUJIMOTO K. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2004, 229:1017-25.
- [4904] BARTSCH H, NAIR J and OWEN RW. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol. Chem.*, 2002, 383:915-21.
- [4914] FREEMAN MR and SOLOMON KR. Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.*, 2004, 91:54-69.
- [4972] MILES EA, ZOUBOULI P, CALDER PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 2005, 21:389-94.
- [4992] CALDER PC, YAQOUB P, THIES F, WALLACE FA, MILES EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.*, 2002, 87:S31-S48.
- [4994] YAQOUB P, KNAPPER JA, WEBB DH, WILLIAMS CM, NEWSHOLME EA, CALDER PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67:129-35.
- [5041] HUGHES-FULFORD M, CHEN Y and TJANDRAWINATA RR. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 2001, 22:701-05.
- [5051] YANG Q, ALEMANY R, CASAS J, KITAJKA K, LANIER SN and ESCRIBÀ PV. Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2005, 68:210-17.
- [5059] OLIVO SE and HILAKIVI-CLARKE L. Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2005, 26:1563-72.
- [5099] HILAKIVI-CLARKE L, CHO E, DEASSIS S, OLIVO S, EALLEY E, BOUKER KB, WELCH JN, KHAN G, CLARKE R and CABANES A. Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. *J. Nutr.*, 2001, 131(1):154S-57S.
- [5101] PAPAConstantinou AD, SHANMUGAM I, SHAN L, SCHROEDER IS, QIU C, YU M and SNYDERWINE EG. Gene expression profiling in the mammary gland of rats treated with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Int. J. Cancer*, 2006, 118:17-24.
- [5127] STARK AH, KOSOY G, ZUSMAN I, YARDEN G and MADAR Z. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring. *Nutr. Cancer*, 2003, 46(1):59-65.
- [5149] MENENDEZ JA, VELLON L, COLOMER R and LUPU R. Effect of  $\delta$ -linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, 97:1611-15.
- [5265] QIU C, SHAN L, YU M and SNYDERWINE EG. Steroid hormone receptor expression and proliferation in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Carcinogenesis*, 2005, 26:763-69.
- [5321] ESCRICH E, SOLANAS M and MORAL R. Olive oil, and other dietary lipids, in 575 cancer: experimental approaches. En "Olive Oil and Health", QUILES JL, RAMIREZ-TORTOSA MC, YAQOUB P, CAB International, Oxfordshire, UK, 2006, pp. 317-74.
- [5367] KEY TJ, APPLEBY PN, REEVES GK *et al.* (49 authors). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95:1218-26.

- [5368] LAHMANN PH, HOFFMANN K, ALLEN N *et al.* (41 authors). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer*, 2004, 111:762-71.
- [5372] QUILES JL, FARQUHARSON AJ, SIMPSON DK, GRANT I and WAHLE KW. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr.*, 2002, 88:225-34.
- [5373] EDER E, WACKER M, LUTZ U, NAIR J, FANG X, BARTSCH H, BELAND FA, SCHLATTER J and LUTZ WK. Oxidative stress related DNA adducts in the liver of female rats fed with sunflower-, rapeseed-, olive- or coconut oil supplemented diets. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 159(2):81-89.
- [5398] MAJUMDER B, WAHLE KW, MOIR S, SCHOFIELD A, CHOE SN, FARQUHARSON A, GRANT I and HEYS SD. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J.*, 2002; 16:1447-49.
- [5419] ANDERSON D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.*, 1996, 350:103-08.
- [5421] GÖNENÇ A, ERTEN D, ASLAN S, AKINCI M, SIMŞEK B and TORUN M. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood and tissue of malignant breast tumor and benign breast disease. *Cell Biol. Int.*, 2006, 30(4):376-80.
- [5423] FRISCH RE, HEGSTED DM and YOSHINAGA K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, 72(10):4172-76.
- [5426] ZHANG Z, BENSON B and LOGAN JL. Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol. Reprod.*, 1992, 47(6):998-1003.
- [5428] KIRTLEY D and MAHER R. Effect of an isocaloric high fat diet on initiation of puberty in Osborne-Mendel rats. *Biol. Reprod.*, 1979, 21:331-38.
- [5447] RAZANI B, WOODMAN SE and LISANTI MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54:431-67.
- [5449] RAJENDRAN L and SIMONS K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.*, 2005, 118:1099-102.
- [5451] SIMONS K and VAZ WLC. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004, 33:269-95.
- [5465] MINEO C, JAMES GL, SMART EJ and ANDERSON RGW. Localization of Epidermal Growth Factor-stimulated Ras/Ras-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:11930-35.
- [5481] ZHUANG L, LIN J, LU ML, SOLOMON KR and FREEMAN MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate Akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2002, 62:2227-31.
- [5484] WALKER SA and LOCKYER PJ. Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci.*, 2004, 117:2879-86.
- [5558] DOWNWARD J. PI3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2004, 15:177-82.
- [5576] GREEN DR and EVAN GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 2002, 1:19-30.
- [5612] SCHLEY PD, BRINDLEY DN and FIELD CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J. Nutr.*, 2007, 137:548-53.
- [5655] BENAKANAKERE I, BESCH-WILLIFORD C, SCHNELL J, BRANDT S, ELLERSIECK MR, MOLINOLO A and HYDER SM. Natural and synthetic progestins accelerate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12:4062-71.
- [5656] GUERRA-ARAIZA C, VILLAMAR-CRUZ O, GONZÁLEZ-ARENAS A, CHAVIRA R and CAMACHO-ARROYO I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.*, 2003, 15:984-90.
- [5659] HAYASHI SI, EGUCHI H, TANIMOTO K, YOSHIDA T, OMOTO Y, INOUE A, YOSHIDA N and YAMAGUCHI Y. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr. Relat. Cancer*, 2003, 10:193-202.
- [5660] CLARKE RB, ANDERSON E and HOWELL A. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2004, 15(7):316-23.
- [5662] ASCENZI P, BOCEDI A and MARINO M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects Med.*, 2006, 27:299-402.
- [5664] NOGUCHI M, TANIYA T, KOYASAKI N, KUMAKI T, MIYAZAKI I and MIZUKAMI Y. Effects of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on tumorigenesis, tumor proliferation, cell kinetics, and receptor contents of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in Sprague-Dawley rats fed a high- or low-fat diet. *Cancer Res.*, 1991, 51(10):2683-89.
- [5672] CUI X, SCHIFF R, ARPINO G, OSBORNE CK and LEE AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23:7721-35.

- [5673] SINGH RR and KUMAR R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J. Cell Biochem.*, 2005, 96:490-505.
- [5676] TESSIER C, DEB S, PRIGENT-TESSIER A, FERGUSON-GOTTSCHALL S, GIBORI GB, SHIU RP and GIBORI G. Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology*, 2000, 141:3842-51.
- [5677] STAUB C, RAUCH M, FERRIÈRE F, TRÉPOS M, DORVAL-COIFFEC I, SAUNDERS PT, COBELLIS G, FLOURIOT G, SALIGAUT C and JÉGOU B. Expression of estrogen receptor ESR1 and its 46-kDa variant in the gubernaculum testis. *Biol. Reprod.*, 2005, 73:703-12.
- [5678] KANG JS, JUNG NJ, KIM S, KIM DJ, JANG DD and YANG KH. Downregulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats. *Eksp. Onkol.*, 2004, 26:31-35.
- [5685] EDWARDS DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.*, 2005, 67:335-76.
- [5686] WIERMAN ME. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv. Physiol. Educ.*, 2007, 31:26-33.
- [5742] E. MARTINEZ DE LA VISTORIA, M. MAÑAS ALMENDROS and J. MARTIN ZÚÑIGA. Nutrición y alimentación. En "Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal". Editores J.M. Zúñiga *et al* Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid-Spain- 2001. Páginas 109-52.
- [5767] KRIS-ETHERTON PM, PEARSON TA, WAN Y, HARGROVE RL, MORIARTY K, FISHELL V and ETHERTON TD. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 70:1009-15.
- [5782] MATTHEWS J and GUSTAFSSON JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.*, 2003, 3:281-92.
- [5784] ROBINSON GW, McKNIGHT RA, SMITH GH and HENNIGHAUSEN L. Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development*, 1995, 121:2079-90.
- [5789] KARIAGINA A, AUPPERLEE MD and HASLAM SZ. Progesterone receptor isoforms and proliferation in the rat mammary gland during development. *Endocrinology*, 2007, 148:2723-36.
- [5795] MANN DR and PLANT TM. Leptin and pubertal development. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2002, 20:93-102.
- [5796] AUBERT ML, PIERROZ DD, GRUAZ NM, D'ALLÈVES V, VUAGNAT BAM, PRALONG FP, BLUM WF and SIZONENKO PC. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropéptido Y and leptin. *Mol. Cel. Endocrinol.*, 1998, 140:107-13.
- [5797] CHEUNG CC, THORNTON JE, NURANI SD, CLIFTON DK and STEINER RA. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*, 2001, 74(1):12-21.
- [5798] NAGATANI S, GUTHIKONDA P and FOSTER DL. Appearance of a nocturnal peak of leptin secretion in the pubertal rat. *Horm. Behav.*, 2000, 37:345-52.
- [5799] SMITH JT and WADDELL BJ. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *J. Endocrinol.*, 2003, 176:313-19.
- [5800] CHEUNG CC, THORNTON JE, KUIJPER JL, WEIGLE DS, CLIFTON DK and STEINER RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, 1997, 138:855-58.
- [5812] VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M and MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 160:1-40.
- [5816] HILAKIVI-CLARKE L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2007, 7(5):465-74.
- [5817] KUIJPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HÄGGBLAD J, NILSSON S and GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 1997, 138:863-70.
- [5820] SPEIRS V, SKLIRIS GP, BURDALL SE and CARDER PJ. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J. Clin. Pathol.*, 2002, 55:371-74.
- [5828] NAVARRO VM, CASTELLANO JM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, BARREIRO ML, ROA J, SANCHEZ-CRIADO JE, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L and TENA-SEMPERE M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of kiss-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinology*, 2004, 145(10):4565-74.
- [5829] NAVARRO VM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, CASTELLANO JM, ROA J, MAYEN A, BARREIRO ML, GAYTAN F, AGUILAR E, PINILLA L, DIEGUEZ C and TENA-SEMPERE M. Advanced vaginal opening and

- precocious activation of the reproductive axis by kiss-1 peptide, the endogenous ligand GPR54. *J. Physiol.*, 2004, 561:379-86.
- [5830] HAN SK, GOTTSCH ML, LEE KJ, POPA SM, SMITH JT, JAKAWICH SK, CLIFTON DK, STEINER RA and HERBISON AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptina as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.*, 2005, 25:11349-56.
- [5844] ACCONCIA F, TOTTA P, OGAWA S, CARDILLO I, INOUE S, LEONE S, TRENTALANCE A, MURAMATSU M and MARINO M. Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J. Cell Physiol.*, 2005, 203:193-201.
- [5845] OLTRA AM, CARBONELL F, TORMOS C, IRADI A and SÁEZ GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, 30(11):1286-92.
- [5846] SANCHEZ M, TORRES JV, TORMOS C, IRADI A, MUÑIZ P, ESPINOSA O, SALVADOR A, RODRIGUEZ-DELGADO J, FANDOS M and SÁEZ GT. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett.*, 2006, 233(1):28-35.
- [5847] SAJI S, JENSEN EV, NILSSON S, RYLANDER T, WARNER M and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:337-42.
- [5849] MARUYAMA K, ENDOH H, SASAKI-IWAOKA H, KANOU H, SHIMAYA E, HASHIMOTO S, KATO S and KAWASHIMA H. A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 246:142-47.
- [5869] ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L and TENA-SEMPERE M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.*, 2008, 29(1):48-69.
- [5879] TODOROVA VK, HARMS SA, KAUFMANN Y, LUO S, LUO KQ, BABB K and KLIMBERG VS. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 88(3):247-56.
- [5887] RAY A, NKHATA KJ, GRANDE JP and CLEARY MP. Diet-induced obesity and mammary tumor development in relation to estrogen receptor status. *Cancer Lett.*, 2007, 253:291-300.
- [5889] JACOB J, SEBASTIAN KS, DEVASSY S, PRIYADARSINI L, FAROOK MF, SHAMEEM A, MATHEW D, SREEJA S and THAMPAN RV. Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2006, 246:34-41.
- [5890] AUPPERLEE MD, SMITH KT, KARIAGINA A and HASLAM SZ. Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology*, 2005, 146:3577-88.
- [5891] LEVIN ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*, 2002, 67:471-75.
- [5892] LEVIN ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.*, 2001, 91:1860-67.
- [5893] KATZENELLENBOGEN BS. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol. Reprod.*, 1996, 54:287-93.
- [5894] CHANG EC, FRASOR J, KOMM B and KATZENELLENBOGEN BS. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology*, 2006, 147:4831-42.
- [5895] ZHAO C, DAHLMAN-WRIGHT K and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl. Recept. Signal.*, 2008, 6:e003.
- [5900] ADACHI S, YAMADA S, TAKATSU Y, MATSUI H, KINOSHITA M, TAKASE K, SUGIURA H, OHTAKI T, MATSUMOTO H, UENOYAMA, TSUKAMURA H, INOUE K and MAEDA KI. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J. Reprod. Dev.*, 2007, 53:367-78.
- [5907] OJEDA SR, LOMNICZI A, MASTRONARDI C, HEGER S, ROTH C, PARENT AS, MATAGNE V and MUNGENAST AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?. *Endocrinology*, 2006, 147:1166-74.
- [5954] CHAPKIN RS, HONG MY, FAN YY, DAVIDSON LA, SANDERS LM, HENDERSON CE, BARHOUMI R, BURGHARDT RC, TURNER ND and LUPTON JR. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids*, 2002; 37:193-99.
- [5965] MORAL R, SOLANAS M, GARCIA G, GRAU L, VELA E, ESCRICH R and ESCRICH E. High corn oil and high extra virgin olive oil diets have different effects on the expression of differentiation-related genes in experimental mammary tumors. *Oncol. Rep.*, 2008, 20(2):429-35.

- [5967] RUSSO IH and RUSSO J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1978, 61(6):1439-49.
- [5970] RUSSO J and RUSSO IH. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1994, 3(4):353-64.
- [5975] DE WAARD F and THIJSEN JHH. Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2005, 97(5):451-8.
- [5985] KHAN G, PENTTINEN P, CABANES A, FOXWORTH A, CHEZEK A, MASTROPOLE K, YU B, SMEDS A, HALTTUNEN T, GOOD C, MÄKELÄ S and HILAKIVI-CLARKE L. Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Reprod. Toxicol.*, 2007, 23(3):397-406.
- [5987] LOHMILLER JJ and SWING SP. Reproduction and breeding. En "The laboratory rat", SUCKOW MA, WEISBROTH SH and FRANKLIN CL, Elsevier, 2006, 147-64.
- [5989] MATSUI H, TAKASU Y, KUMANO S, MATSUMOTO H and OHTAKI T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 320(2):383-88.
- [6003] SMITH JT, POPA SM, CLIFTON DK, HOFFMAN GE and STEINER RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neurosci.*, 2006, 26(25):6687-94.
- [6007] WANG H, ERIKSSON H and SAHLIN L. Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 2000, 63:1331-40.
- [6009] RUSSO J and RUSSO IH. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res.*, 1980, 40:2677-87.
- [6051] GALLUS S, BOSETTI C, LA VECCHIA C. Mediterranean diet and cancer risk. *Eur J Cancer Prev.* 2004 Oct;13(5):447-52.
- [6060] FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, MARTINI AC, NAVARRO VM, CASTELLANO JM, DIEGUEZ C, AGUILAR E, PINILLA L and TENA-SEMPERE M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006, 254-255:127-32.
- [6061] FITÓ M, DE LA TORRE R and COVAS MI. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51:1215-24.
- [6062] LOSCALZO J. Membrane redox state and apoptosis: death by peroxide. *Cell Metab.*, 2008, 8(3):182-83.
- [6063] ANBUSELVAM C, VIJAYAVEL K and BALASUBRAMANIAN MP. Protective effect of *Operculina turpethum* against 7,12-dimethyl benz(a)anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. *Chem. Biol. Interact.*, 2007, 20;168(3):229-36.
- [6065] ROTRUCK JT, POPE AL, GANTHER HE, SWANSON AB, HAFEMAN DG and HOEKSTRA WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973, 179:588-90.
- [6067] RAY G, BATRA S, SHUKLA NK, DEO S, RAINA V, ASHOK S and HUSAIN SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2000, 59(2):163-70.
- [6069] MANGAS-CRUZ MA, FERNÁNDEZ-MOYANO A, ALBI T, GUINDA A, RELIMPIO F, LANZÓN A, PEREIRA JL, SERRERA JL, MONTILLA C, ASTORGA R and GARCÍA-LUNA PP. Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clin. Nutr.*, 2001, 20:211-15.
- [6071] FORSBERG L, DE FAIRE U and MORGENSTERN R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, 389:84-93.
- [6072] MENSE SM, REMOTTI F, BHAN A, SINGH B, EL-TAMER M, HEI TK and BHAT HK. Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008, 232(1):78-85.
- [6074] COLLINS AR, DUSINSKÁ M, GEDIK CM and STĚTINA R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104 Suppl 3:465-69.
- [6075] ESTEVE JM, MOMPO J, GARCIA DE LA ASUNCION J, SASTRE J, ASENSI M, BOIX J, VINA JR, VINA J and PALLARDO FV. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J.*, 1999, 13(9):1055-64.
- [6076] MOYSAN A, MARQUIS I, GABORIAU F, SANTUS R, DUBERTRET L and MORLIÈRE P. Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, 1993, 100:692-98.

- [6077] KINNULA VL and CRAPO JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 36:718-44.
- [6078] JEFFERIES H, COSTER J, KHALIL A, BOT J, MCCAULEY RD and HALL JC. Glutathione. *ANZ J. Surg.*, 2003, 73:517-22.
- [6080] WEINBRENNER T, FITÓ M, DE LA TORRE R, SAEZ GT, RIJKEN P, TORMOS C, COOLEN S, ALBALADEJO MF, ABANADES S, SCHRODER H, MARRUGAT J and COVAS MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J. Nutr.*, 2004, 134(9):2314-21.
- [6083] PADMAVATHI R, SENTHILNATHAN P and SAKTHISEKARAN D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, 143(3):349-54.
- [6093] World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. WCRF and AICR. AICR, Washington DC. 2007. 517 pages.
- [6094] MARTIN RC, LIU Q, WO JM, RAY MB and LI Y. Chemoprevention of carcinogenic progression to esophageal adenocarcinoma by the manganese superoxide dismutase supplementation. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13:5176-82.
- [6095] OBERLEY LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.*, 2005, 59(4):143-48.
- [6105] SEMINARA SB, MESSENGER S, CHATZIDAKI EE *et al.* (20 authors). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 349:1614-27.
- [6120] HALL PA, COATES PJ, GOODLAD RA, HART IR and IANE DP. Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors in vivo. *Br. J. Cancer*, 1994, 70:244-47.
- [6134] KUMARAGURUPARAN R, SESHAGIRI PB, HARA Y and NAGINI S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by black tea polyphenols: modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Mol. Carcinog.*, 2007, 46(9):797-806.
- [6136] BRIGELIUS-FLOHÉ R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27:951-65.
- [6137] MOSELHY SS and AL MSLMANI MA. Chemopreventive effect of lycopene alone or with melatonin against the genesis of oxidative stress and mammary tumors induced by 7,12 dimethyl(a)benzanthracene in sprague dawley female rats. *Mol. Cell Biochem.*, 2008, 319(1-2):175-80.
- [6138] CADENAS E and DAVIES KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 29(3-4):222-30.
- [6139] NAVARRO A and BOVERIS A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Cell Physiol.*, 2007, 292:670-86.
- [6140] SAVASKAN NE, BORCHERT A, BRÄUER AU and KUHN H. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, 43:191-201.
- [6141] MURUGAN RS, MOHAN KV, UCHIDA K, HARA Y, PRATHIBA D and NAGINI S. Modulatory effects of black tea polyphenols on oxidant-antioxidant profile and expression of proliferation, apoptosis, and angiogenesis-associated proteins in the rat forestomach carcinogenesis model. *J. Gastroenterol.*, 2007, 42:352-61.
- [6142] KÜHN H and BORCHERT A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33:154-72.
- [6143] GIULIVI C and CADENAS E. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, 1366(3):265-74.
- [6144] NOMURA K, IMAI H, KOUMURA T, ARAI M and NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:29294-302.
- [6145] NAKAGAWA Y. Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, 27(7):956-60.
- [6147] KELLER JN, KINDY MS, HOLTSBERG FW, ST CLAIR DK, YEN HC, GERMEYER A, STEINER SM, BRUCE-KELLER AJ, HUTCHINS JB and MATTSON MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.*, 1998, 18:687-97.
- [6148] PERUMAL SS, SHANTHI P and SACHDANANDAM P. Combined efficacy of tamoxifen and coenzyme Q10 on the status of lipid peroxidation and antioxidants in DMBA induced breast cancer. *Mol. Cell Biochem.*, 2005, 273(1-2):151-60.

- [6182] HINSHELWOOD RA and CLARK SJ. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *J. Mol. Med.*, 2008, 86:1315-28.
- [6192] KHANZODE SS, MUDDESHWAR MG, KHANZODE SD and DAKHALE GN. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radic. Res.*, 2004, 38(1):81-85.
- [6193] NAIR J, VACA CE, VELIC I, MUTANEN M, VALSTA LM and BARTSCH H. High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1997, 6(8):597-601.
- [6196] COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M and LUNEC J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003, 17(10):1195-214.
- [6197] FANG JL, VACA CE, VALSTA LM and MUTANEN M. Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis*, 1996, 17(5):1035-40.
- [6226] De ROUX N, GENIN E, CAREL JC, MATSUDA F, CHAUSSAIN JL and MILGROM E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the kiss-1 derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100:10972-76.
- [6238] LEE JH, MIELE ME, HICKS DJ, PHILLIPS KK, TRENT JM, WEISSMAN BE and WELCH DR. KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88:1731-37.
- [6239] GOTTSCH ML, CLIFTON DK and STEINER RA. From kiss1 to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 2009, 30:4-9.
- [6242] OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S *et al.* (21 authors). Metastasis suppressor gene *kiss-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001, 411:613-17.
- [6290] MICHEL V and BAKOVIC M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell*, 2007, 99:129-40.
- [6302] BOUGNOUX P, GIRAUDEAU B and COUET C. Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, 15(3):416-21.
- [6319] MEDVEDOVIC M, GEAR R, FREUDENBERG JM *et al.* (13 authors). Influence of fatty acid diets on gene expression in rat mammary epithelial cells. *Physiol. Genomics*, 2009, 38:80-88.
- [6321] SCHULZ M, HOFFMANN K, WEIKERT C, NÖTHLINGS U, SCHULZE MB and BOEING H. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) - Postdam study. *Br. J. Nutr.*, 2008, 100:942-46.
- [6336] YAQOOB P. The nutritional significance of lipid rafts. *Annu. Rev. Nutr.*, 2009, 29:257-82.
- [6338] SCHMITZ G and ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 2008, 47:147-55.
- [6339] CHAPKIN RS, McMURRAY DN, DAVIDSON LA, PATIL BS, FAN YY and LUPTON JR. Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action. *Br. J. Nutr.*, 2008, 100:1152-57.
- [6417] SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 1997, 82(2):291-95.
- [6418] PACKER L and CADENAS E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 2007, 41(9):951-52.
- [6419] DAVIES KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, 1999, 48(1):41-47.
- [6420] ADAM-VIZI V and CHINOPOULOS C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2006, 27(12):639-45.
- [6421] CATALÁ A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2006, 38(9):1482-95.
- [6422] WAGNER BA, BUETTNER GR and BURNS CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, 1994, 33(15):4449-53.
- [6430] ZMIJEWSKI JW, LANDAR A, WATANABE N, DICKINSON DA, NOGUCHI N and DARLEY-USMAR VM. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, 33:1385-89.
- [6432] ZAFIRIOU MP, DEVA R, CICCOLI R, SIAFAKA-KAPADAI A and NIGAM S. Biological role of hepxilins: upregulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as a cellular response to oxidative stress?. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2007, 77:209-15.
- [6433] WANG M, DHINGRA K, HITTELMAN WN, LIEHR JG, DE ANDRADE M and LI D. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1996, 5(9):705-10.
- [6434] CHIARUGI P and FIASCHI T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal.*, 2007, 19:672-82.

- [6435] CROSS JV and TEMPLETON DJ. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2006, 8:1819-27.
- [6436] GHEZZI P. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic. Res.*, 2005, 39:573-80.
- [6438] OKADO-MATSUMOTO A and FRIDOVICH I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(42):38388-93.
- [6440] SUN Y, OBERLEY LW, ELWELL JH and SIERRA-RIVERA E. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. *Int. J. Cancer*, 1989, 44:1028-33.
- [6441] ARTHUR JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.*, 2000, 57:1825-35.
- [6443] VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, RHODES CJ and TELSER J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.*, 2004, 266:37-56.
- [6444] GREENE EL and PALLER MS. Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub><sup>-</sup> in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1992, 263(2 Pt 2):F251-5.
- [6446] ESWORTHY RS, SWIDEREK KM, HO YS and CHU FF. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1381:213-26.
- [6448] PINCHUK I, SCHNITZER E and LICHTENBERG D. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1389:155-72.
- [6450] DAVIES KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262:9895-901.
- [6451] BAE YS, KANG SW, SEO MS, BAINES IC, TEKLE E, CHOCK PB and RHEE SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:217-21.
- [6452] SALMEEN A and BARFORD D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid. Redox Signal.*, 2005, 7:560-77.
- [6453] CHEN CY, WILLARD D and RUDOLPH J. Redox regulation of SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatases by two backdoor cysteines. *Biochemistry*, 2009, 48:1399-409.
- [6454] MCCORD JM and FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244:6049-55.
- [6455] BEHREND L, HENDERSON G and ZWACKA RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31(Pt 6):1441-44.
- [6456] OBERLEY TD and OBERLEY LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.*, 1997, 12(2):525-35.
- [6458] SEILER A, SCHNEIDER M, FÖRSTER H, ROTH S, WIRTH EK, CULMSEE C, PLESNILA N, KREMMER E, RÄDMARK O, WURST W, BORNKAMM GW, SCHWEIZER U and CONRAD M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab.*, 2008, 8:237-48.
- [6459] ESTERBAUER H, SCHAUR RJ and ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, 11:81-128.
- [6461] SEN CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top Cell Regul.*, 2000, 36:1-30.
- [6462] BISWAS S, CHIDA AS and RAHMAN I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 71:551-64.
- [6464] PACIFICI RE and DAVIES KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 1991, 37:166-80.
- [6465] GUAJARDO MH, TERRASA AM and CATALÁ A. Lipid-protein modifications during ascorbate-Fe<sup>2+</sup> peroxidation of photoreceptor membranes: protective effect of melatonin. *J. Pineal Res.*, 2006, 41:201-10.
- [6467] CABISCOL E, PIULATS E, ECHAVE P, HERRERO E and ROS J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:27393-98.
- [6468] MENG TC, FUKADA T and TONKS NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell.*, 2002, 9:387-99.
- [6469] KWON J, LEE SR, YANG KS, AHN Y, KIM YJ, STADTMAN ER and RHEE SG. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101:16419-24.
- [6470] HUMPHRIES KM, JULIANO C and TAYLOR SS. Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:43505-11.

## Bibliografía

- [6474] PEREZ-GRACIA E, BLANCO R, CARMONA M, CARRO E and FERRER I. Oxidative stress damage and oxidative stress responses in the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2009, 118:497-504.
- [6478] YIN H and PORTER NA. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid. Redox Signal.*, 2005, 7:170-84.
- [6479] UCHIDA K, SHIRAIISHI M, NAITO Y, TORII Y, NAKAMURA Y and OSAWA T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:2234-42.
- [6480] HUMPHRIES KM and SZWEDA LI. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*, 1998, 37:15835-41.
- [6481] KRISTAL BS, PARK BK and YU BP. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:6033-38.
- [6482] CRAPO JD, OURY T, RABOUILLE C, SLOT JW and CHANG LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:10405-09.
- [6483] NONAKA Y, IWAGAKI H, KIMURA T, FUCHIMOTO S and ORITA K Effect of reactive oxygen intermediates on the in vitro invasive capacity of tumor cells and liver metastasis in mice. *Int. J. Cancer*, 1993, 54:983-86.
- [6484] MURAMATSU H, KOGAWA K, TANAKA M, OKUMURA K, NISHIHORI Y, KOIKE K, KUGA T and NIITSU Y. Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. *Cancer Res.*, 1995, 55:6210-14.
- [6485] MARKLUND SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.*, 1984, 74:1398-403.
- [6486] JÄRVINEN K, PIETARINEN-RUNTTI P, LINNAINMAA K, RAIVIO KO, KREJSA CM, KAVANAGH T and KINNULA VL. Antioxidant defense mechanisms of human mesothelioma and lung adenocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000, 278:696-702.
- [6487] ZYAD A, BÉNARD J, TURSZ T, CLARKE R and CHOUAIB S. Resistance to TNF-alpha and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression. *Cancer Res.*, 1994, 54:825-31.
- [6488] SUN Y, COLBURN NH and OBERLEY LW. Decreased expression of manganese superoxide dismutase mRNA and protein after immortalization and transformation of mouse liver cells. *Oncol. Res.*, 1993, 5:127-32.
- [6489] ST CLAIR DK and HOLLAND JC. Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res.*, 1991, 51:939-43.
- [6490] SAFFORD SE, OBERLEY TD, URANO M and ST CLAIR DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.*, 1994, 54:4261-65.
- [6491] OURY TD, CHANG LY, MARKLUND SL, DAY BJ and CRAPO JD. Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab. Invest.*, 1994, 70:889-98.
- [6493] BIANCHI MS, BIANCHI NO and BOLZÁN AD. Superoxide dismutase activity and superoxide dismutase-1 gene methylation in normal and tumoral human breast tissues. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1992, 59(1):26-29.
- [6494] SOINI Y, VAKKALA M, KAHLOS K, PÄÄKKÖ P and KINNULA V. MnSOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in in situ carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. *J. Pathol.*, 2001, 195(2):156-62.
- [6495] LU YP, LOU YR, YEN P, NEWMARK HL, MIROCHNITCHENKO OI, INOUE M and HUANG MT. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Res.*, 1997, 57(8):1468-74.
- [6496] CLARK LC, COMBS GF JR, TURNBULL BW *et al.* (16 authors). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 1996, 276:1957-63.
- [6497] COMBS GF JR. Status of selenium in prostate cancer prevention. *Br. J. Cancer*, 2004, 91:195-99.
- [6504] URSINI F, MAIORINO M, VALENTE M, FERRI L and GREGOLIN C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 710:197-211.
- [6505] AUMANN KD, BEDORF N, BRIGELIUS-FLOHÉ R, SCHOMBURG D and FLOHÉ L. Glutathione peroxidase revisited--simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomed. Environ. Sci.*, 1997, 10:136-55.

- [6506] THOMAS JP and GIROTTI AW. Photooxidation of cell membranes in the presence of hematoporphyrin derivative: reactivity of phospholipid and cholesterol hydroperoxides with glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 962:297-307.
- [6507] THOMAS JP, MAIORINO M, URSINI F and GIROTTI AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:454-61.
- [6510] YANT LJ, RAN Q, RAO L, VAN REMMEN H, SHIBATANI T, BELTER JG, MOTTA L, RICHARDSON A and PROLLA TA. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34:496-502.
- [6513] MASELLA R, DI BENEDETTO R, VARI R, FILESI C and GIOVANNINI C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005, 16(10):577-86.
- [6514] SUH J, ZHU BZ and FREI B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34:1306-14.
- [6517] SCHRAUZER GN. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell Mol. Life Sci.*, 2000, 57(13-14):1864-73.
- [6518] GALATI G and O'BRIEN PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 37(3):287-303.
- [6519] RICE-EVANS C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8(7):797-807.
- [6520] PRYOR WA and STANLEY JP. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.*, 1975, 40(24):3615-17.
- [6521] CHENG KC, CAHILL DS, KASAI H, NISHIMURA S and LOEB LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267(1):166-72.
- [6523] HONG MY, BANCROFT LK, TURNER ND, DAVIDSON LA, MURPHY ME, CARROLL RJ, CHAPKIN RS and LUPTON JR. Fish oil decreases oxidative DNA damage by enhancing apoptosis in rat colon. *Nutr. Cancer.*, 2005, 52(2):166-75.
- [6524] DU C, SATO A, WATANABE S, WU CZ, IKEMOTO A, ANDO K, KIKUGAWA K, FUJII Y and OKUYAMA. Cholesterol synthesis in mice is suppressed but lipofuscin formation is not affected by long-term feeding of n-3 fatty acid-enriched oils compared with lard and n-6 fatty acid-enriched oils. *H. Biol. Pharm. Bull.*, 2003, 26(6):766-70.
- [6525] MOORE MN. Orthopedic pitfalls in emergency medicine. *South Med. J.*, 1988, 81:371-78.
- [6526] VISIOLI F, COLOMBO C and GALLI C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 245:487-89.
- [6529] MANNELLO F, TONTI GA and MEDDA V. Protein oxidation in breast microenvironment: Nipple aspirate fluid collected from breast cancer women contains increased protein carbonyl concentration. *Cell Oncol.*, 2009, 31:383-92.
- [6530] PASTORE A, FEDERICI G, BERTINI E and PIEMONTE F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, 2003, 333:19-39.
- [6537] VINOETHINI G, MANIKANDAN P, ANANDAN R and NAGINI S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Azadirachta indica* leaf fractions: modulation of hormone status, xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47:1852-63.
- [6551] TERMAN A and BRUNK UT. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, 36:1400-04.
- [6552] VIARENGO A, LOWE D, BOLOGNESI C, FABBRI E and KOEHLER A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2007, 146(3):281-300.
- [6556] ROBERTS LJ and MORROW JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 28:505-13.
- [6557] NOUROOZ-ZADEH J. Key issues in F2-isoprostane analysis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, 36(Pt 5):1060-65.
- [6559] MORROW JD, ROBERTS LJ, DANIEL VC, AWAD JA, MIROCHNITCHENKO O, SWIFT LL and BURK RF. Comparison of formation of D2/E2-isoprostanes and F2-isoprostanes in vitro and in vivo--effects of oxygen tension and glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, 353:160-71.
- [6569] CATALANO S, MAURO L, MARSICO S, GIORDANO C, RIZZA P, RAGO V, MONTANARO D, MAGGIOLINI M, PANNO ML and ANDÓ S. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor  $\alpha$  in MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(19):19908-15.
- [6571] MORROW JD, AWAD JA, BOSS HJ, BLAIR IA and ROBERTS LJ 2nd. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:10721-25.

- [6577] SINHA RJ, SINGH R, MEHROTRA S and SINGH RK. Implications of free radicals and antioxidant levels in carcinoma of the breast: a never-ending battle for survival. *Indian J. Cancer*, 2009, 46:146-50.
- [6581] AZZI A, GYSIN R, KEMPNA P, MUNTEANU A, VILLACORTA L, VISARIUS T, ZINGG JM. Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol. Chem.*, 2004, 385:585-91.
- [6591] CIRILLO D, RACHIGLIO AM, LA MONTAGNA R, GIORDANO A and NORMANNO N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *J. Cell. Biochem.*, 2008, 105:956-64.
- [6596] WANG Y, LAM KSL and XU A. Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res.*, 2007, 17(4):280-82.
- [6597] KELESIDIS I, KELESIDIS T and MANTZOROS CS. Adiponectin and cancer: a systematic review. *Br. J. Cancer*, 2006, 94(9):1221-25.
- [6599] FERNÁNDEZ-QUINTELA A, CHURRUCA I and PORTILLO MP. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.*, 2007, 10:1126-31.
- [6609] WIDSCHWENDTER M and JONES PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 2002, 21:5462-82.
- [6611] SCACCINI C, NARDINI M, D'AQUINO M, GENTILI V, DI FELICE M and TOMASSI G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.*, 1992, 33:627-33.
- [6613] THOMPSON LU, SEIDL MM, RICKARD SE, ORCHESON LJ and FONG HH. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr. Cancer*, 1996, 26:159-65.
- [6614] CATALÁ A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*, 2009, 157:1-11.
- [6618] NIGAM S, SCHEWE T. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1488:167-81.
- [6619] APPLEMAN D, SKAVINSKI ER and STEIN AM. Catalase studies on normal and cancerous rats. *Cancer Res.*, 1950, 10:498-505.
- [6620] SIRIKHACHORNKIT A, SHIN JW, BAROLI I and NIYOGI KK. Replacement of alpha-tocopherol by beta-tocopherol enhances resistance to photooxidative stress in a xanthophyll-deficient strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 2009, 8:1648-57.
- [6621] BARACALDO C, POVEDA E, ORDÓÑEZ E, RODRÍGUEZ E, AYALA P, DELGADO W and GUERRA M. Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas, como respuesta a la suplementación con aceites vegetales de diferentes fuentes. *Lecturas sobre nutrición*, 2004, 11(1): 36-43.
- [6622] HOSOMI A, ARITA M, SATO Y, KIYOSE C, UEDA T, IGARASHI O, ARAI H and INOUE K. Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.*, 1997, 409:105-08.
- [6623] YOSHIDA Y, NIKI E and NOGUCHI N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem. Phys. Lipids*, 2003, 123:63-75.
- [6625] SOWERS JR. Endocrine functions of adipose tissue: focus on adiponectin. *Clin. Cornerstone*, 2008, 9:32-40.
- [6645] CHRISTOU M, SAVAS U, SCHROEDER S, SHEN X, THOMPSON T, GOULD MN and JEFCOATE CR. Cytochromes CYP1A1 and CYP1B1 in the rat mammary gland: cell-specific expression and regulation by polycyclic aromatic hydrocarbons and hormones. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1995, 115:41-50.
- [6656] BROWN NM and LAMARTINIERE CA. Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. *Environ. Health Perspect.*, 1995, 103(7-8):708-13.
- [6658] KRATZ M, Von ECKARDSTEIN A, FOBKER M, BUYKEN A, POSNY N, SCHULTE H, ASSMANN G and WAHRBURG U. The impact of dietary fat composition on serum leptin concentrations in healthy nonobese men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87:5008-14.
- [6659] CAMMISOTTO PG, GÉLINAS Y, DESHAIES Y and BUKOWIECKI LJ. Regulation of leptin secretion from white adipocytes by free fatty acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2003, 285:521-26.
- [6660] LEE JM and FRIED SK. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009, 296:E1230-E38.
- [6661] MESSINIS IE, PAPAGEORGIOU I, MILINGOS S, ASPRODINI E, KOLLIOS G and SEFERIADIS K. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Human Reprod.*, 2001, 16:1827-32.
- [6664] EMERIT J, EDEAS M, BRICAIRE F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.*, 2004, 58:39-46.
- [6665] CHUNG KY, LEE SJ, CHUNG SM, LEE MY, BAE ON and CHUNG JH. Generation of free radical by interaction of iron with thiols in human plasma and its possible significance. *Thromb. Res.*, 2005, 116:157-64.

- [6666] FAUCHER K, RABINOVITCH-CHABLE H, COOK-MOREAU J, BARRIÈRE G, STURTZ F and RIGAUD M. Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells. *Mol. Cell Biochem.*, 2005, 277:81-87.
- [6671] BODZIOCH M, DEMBINSKA-KIEC A, HARTWICH J *et al.* (20 authors). The microarray expression analysis identifies BAX as a mediator of beta-carotene effects on apoptosis. *Nutr. Cancer*, 2005, 51:226-35.
- [6672] PALOZZA P, SERINI S, TORSELLO A, DI NICUOLO F, MAGGIANO N, RANELLETTI FO, WOLF FI and CALVIELLO G. Mechanism of activation of caspase cascade during beta-carotene-induced apoptosis in human tumor cells. *Nutr. Cancer*, 2003, 47:76-87.
- [6673] SUZANA S, CHAM BG, AHMAD ROHI G, MOHD RIZAL R, FAIRULNIZAL MN, NORMAH H and FATIMAH A. Relationship between selenium and breast cancer: a case-control study in the Klang Valley. *Singapore Med. J.*, 2009, 50:265-69.
- [6674] BORAWSKA MH, SOCHA K, ŁAZARCZYK B, CZYZEWSKA E, MARKIEWICZ R and DAREWICZ B. The effects of diet on selenium concentration in serum in patients with cancer. *Nutr. Cancer*, 2009, 61:629-33.
- [6677] YIN N, WANG D, ZHANG H, YI X, SUN X, SHI B, WU H, WU G, WANG X and SHANG Y. Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin. *Cancer Res.*, 2004, 64:5870-75.
- [6680] RAZANDI M, PEDRAM A and LEVIN ER. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 2000, 14:1434-47.
- [6681] CHENG G, WEIHUA Z, WARNER M and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101:3739-46.
- [6682] SILBERSTEIN GB, VAN HORN K, HRABETA-ROBINSON E and COMPTON J. Estrogen-triggered delays in mammary gland gene expression during the estrous cycle: evidence for a novel timing system. *J. Endocrinol.*, 2006, 190:225-39.
- [6683] PAOLISSO G, RIZZO MR, MONE CM, TAGLIAMONTE MR, GAMBARDELLA A, RIONDINO M, CARELLA C, VARRICCHIO M and D'ONOFRIO F. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1998, 48:291-97.
- [6691] PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERLAY, J.,TEPPO, L. and THOMAS, D.B. (eds), *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII*, IARC Scientific Publications No. 155, IARC, Lyon, 2002.
- [6692] RUIZ-GUTIÉRREZ V, PÉREZ-ESPINOSA A, VÁZQUEZ CM and SANTA-MARÍA C. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br. J. Nutr.*, 1999, 82(3):233-41.
- [6712] VINOTHINI G, MANIKANDAN P, ANANDAN R and NAGINI S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Azadirachta indica* leaf fractions: modulation of hormone status, xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(8):1852-63.
- [6713] SIERI S, KROGH V, FERRARI P, *et al* (50 authors). Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 88(5):1304-12.
- [6714] DAVIS L and KUTTAN G. Effect of *Withania somnifera* on DMBA induced carcinogenesis. *J. Ethnopharmacol.*, 2001, 75(2-3):165-68.
- [6715] RAJNEESH CP, MANIMARAN A, SASIKALA KR and ADAIKAPPAN P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med. J.*, 2008, 49(8):640-43.
- [6717] SAYDAM N, KIRB A, DEMIR O, HAZAN E, OTO O, SAYDAM O and GÜNER G. Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Lett.*, 1997, 119(1):13-19.
- [6718] SKRZYDLEWSKA E, STANKIEWICZ A, SULKOWSKA M, SULKOWSKI S and KASACKA I. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 2001, 64(3):213-22.
- [6720] YUVARAJ S, PREMKUMAR VG, VIJAYASARATHY K, GANGADARAN SG and SACHDANANDAM P. Augmented antioxidant status in Tamoxifen treated postmenopausal women with breast cancer on co-administration with Coenzyme Q10, Niacin and Riboflavin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008, 61(6):933-41.
- [6721] JARUGA P, ZASTAWNY TH, SKOKOWSKI J, DIZDAROGLU M and OLINSKI R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.*, 1994, 341(1):59-64.
- [6728] ARIVAZHAGAN S, BALASENTHIL S and NAGINI S. Garlic and neem leaf extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzymes during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced gastric carcinogenesis in rats. *Phytother. Res.*, 2000, 14(4):291-93.
- [6743] YEH CC, HOU MF, TSAI SM, LIN SK, HSIAO JK, HUANG JC, WANG LH, WU SH, HOU LA, MA H and TSAI LY. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin. Chim. Acta*, 2005, 361(1-2):104-11.

- [6750] SEVEN A, ERBIL Y, SEVEN R, INCI F, GÜLYAŞAR T, BARUTÇU B and CANDAN G. Breast cancer and benign breast disease patients evaluated in relation to oxidative stress. *Cancer Biochem. Biophys.*, 1998, 16(4):333-45.
- [6753] DOMITROVIC R, TOTA M and MILIN C. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2006, 113(2):177-91.
- [6754] SIES H, STAHL W and SEVANIAN A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J. Nutr.*, 2005, 135(5):969-72.
- [6755] QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M, RAMÍREZ-TORTOSA MC, CASSINELLO M, MATAIX J, LOPEZ-FRIAS M and MAÑAS M. The intake of fried virgin olive or sunflower oils differentially induces oxidative stress in rat liver microsomes. *Br. J. Nutr.*, 2002, 88(1):57-65.
- [6756] NAVARRO J, OBRADOR E, CARRETERO J, PETSCHEN I, AVIÑÓ J, PEREZ P and ESTRELA JM. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(3-4):410-18.
- [6759] VOEHRINGER DW, MCCONKEY DJ, MCDONNELL TJ, BRISBAY S and MEYN RE. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(6):2956-60.
- [6760] ESTRELA JM, ORTEGA A and OBRADOR E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2006, 43(2):143-81.
- [6761] OBRADOR E, NAVARRO J, MOMPO J, ASENSI M, PELLICER JA and ESTRELA JM. Regulation of tumour cell sensitivity to TNF-induced oxidative stress and cytotoxicity: role of glutathione. *Biofactors*, 1998, 8(1-2):23-26.
- [6764] YEH CC, HOU MF, WU SH, TSAI SM, LIN SK, HOU LA, MA H and TSAI LY. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 2006, 24(6):555-59.
- [6769] XUE W, WARSHAWSKY D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 206:73-93.
- [6772] OLIVO-MARSTON SE, ZHU Y, LEE RY, CABANES A, KHAN G, ZWART A, WANG Y, CLARKE R and HILAKIVI-CLARKE L. Gene signaling pathways mediating the opposite effects of prepubertal low-fat and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. *Cancer Prev. Res.*, 2008, 1(7):532-45.
- [6775] SIERENS J, HARTLEY JA, CAMPBELL MJ, LEATHEM AJ and WOODSIDE JV. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat. Res.*, 2001, 485(2):169-76.
- [6776] NAGASHIMA M, TSUDA H, TAKENOSHITA S, NAGAMACHI Y, HIROHASHI S, YOKOTA J and KASAI H. 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Lett.*, 1995, 90(2):157-62.
- [6781] ROSSNER P JR, GAMMON MD, TERRY MB, AGRAWAL M, ZHANG FF, TEITELBAUM SL, ENG SM, GAUDET MM, NEUGUT AI and SANTELLA RM. Relationship between urinary 15-F2t-isoprostane and 8-oxodeoxyguanosine levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, 15(4):639-44.
- [6782] WATTERS JL, SATIA JA, DA COSTA KA, BOYSEN G, COLLINS LB, MORROW JD, MILNE GL and SWENBERG JA. Comparison of three oxidative stress biomarkers in a sample of healthy adults. *Biomarkers*, 2009, 14(8):587-95.
- [6783] HIMMETOGLU S, DINCER Y, ERSOY YE, BAYRAKTAR B, CELIK V and AKCAY T. DNA oxidation and antioxidant status in breast cancer. *J. Investig. Med.*, 2009, 57(6):720-23.
- [6784] LO CY, HSIEH PH, CHEN HF and SU HM. A maternal high-fat diet during pregnancy in rats results in a greater risk of carcinogen-induced mammary tumors in the female offspring than exposure to a high-fat diet in postnatal life. *Int. J. Cancer*, 2009, 125(4):767-73.
- [6786] DEWA Y, NISHIMURA J, MUGURUMA M, JIN M, KAWAI M, SAEGUSA Y, OKAMURA T, UMEMURA T and MITSUMORI K. Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats. *Arch. Toxicol.*, 2009, 83(5):503-11.
- [6793] RAO CV, HIROSE Y, INDRAINE C and REDDY BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.*, 2001, 61:1927-33.
- [6794] SAJI S, OMOTO Y, SHIMIZU C, WARNER M, HAYASHI Y, HORIGUCHI S, WATANABE T, HAYASHI S, GUSTAFSSON JA and TOI M. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res.*, 2002, 62:4849-53.
- [6795] SHYAMALA G, YANG X, CARDIFF RD and DALE E. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:3044-49.
- [6797] WIESEN JF, YOUNG P, WERB Z and CUNHA GR. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development*, 1999, 126(2):335-44.

- [6798] WANG C, FU M, ANGELETTI RH, SICONOLFI-BAEZ L, *et al.* (14 authors). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:18375-83.
- [6799] VALLEY CC, MÉTIVIER R, SOLODIN NM, FOWLER AM, MASHEK MT, HILL L and ALARID ET. Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus. *Mol. Cell Biol.*, 2005, 25(13):5417-28.
- [6801] SHUPNIK MA. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J. Neuroendocrinol.*, 2002, 14:85-94.
- [6802] SAR M and WELSCH F. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*, 1999, 140:963-71.
- [6803] ROGER P, SAHLA ME, MÄKELÄ S, GUSTAFSSON JA, BALDET P and ROCHEFORT H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.*, 2001, 61(6):2537-41.
- [6805] PIETRAS RJ and SZEGO CM. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem. J.*, 1980, 191:743-60.
- [6806] PENG B, LU B, LEYGUE E and MURPHY LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J. Mol. Endocrinol.*, 2003, 30:13-29.
- [6807] PEARCE ST and JORDAN VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004, 50:3-22.
- [6810] CONNEELY OM, MULAC-JERICEVIC B and LYDON JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, 2003, 68:771-78.
- [6811] MULAC-JERICEVIC B, LYDON JP, DEMAYO FJ and CONNEELY OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100:9744-49.
- [6812] MOTE PA, BARTOW S, TRAN N and CLARKE CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002, 72:163-72.
- [6813] MITCHNER NA, GARLICK C and BEN-JONATHAN N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 1998, 139:3976-83.
- [6814] MARINO M, ACCONCIA F, BRESCIANI F, WEISZ A and TRENTALANCE A. Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol. Biol. Cell*, 2002, 13:3720-29.
- [6816] HIROI H, INOUE S, WATANABE T, GOTO W, ORIMO A, MOMOEDA M, TSUTSUMI O, TAKETANI Y and MURAMATSU M. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *J. Mol. Endocrinol.*, 1999, 22:37-44.
- [6818] FENDRICK JL, RAAFAT AM and HASLAM SZ. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1998, 3:7-22.
- [6819] FAIVRE E, SKILDUM A, PIERSON-MULLANY L and LANGE CA. Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids*, 2005, 70(5-7):418-26.
- [6823] BOYAPATI SM, SHU XO, GAO YT, DAI Q, YU H, CHENG JR, JIN F and ZHENG W. Correlation of blood sex steroid hormones with body size, body fat distribution, and other known risk factors for breast cancer in postmenopausal Chinese women. *Cancer Causes Control*, 2004, 15:305-11.
- [6824] OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y and MURAMATSU M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 243:122-26.
- [6827] OI-KANO Y, KAWADA T, WATANABE T, KOYAMA F, WATANABE K, SENBONGI R and IWAI K. Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2007, 18(10):685-92.
- [6828] ROSNER B, COLDITZ GA and WILLETT WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1994, 139:819-35.
- [6842] AZHAR S, LEERS-SUCHETA S and REAVEN E. Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues: the SR-BI and 'selective' pathway connection. *Front. Biosci.*, 2003, 8:S998-S1029.
- [6845] CLARKE R, SKAAR T, BAUMANN K, LEONESSA F, JAMES M, LIPPMAN J, THOMPSON EW, FRETHER C and BRUNNER N. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1994, 31(2-3):237-48.

## Bibliografía

- [6846] SHAABAN AM, O'NEILL PA, DAVIES MP, SIBSON R, WEST CR, SMITH PH and FOSTER CS. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2003, 27:1502-12.
- [6848] CAMACHO-ARROYO I, GUERRA-ARAIZA C and CERBÓN MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport.*, 1998, 9:3993-96.
- [6857] BOYD NF, MARTIN LJ, YAFFE MJ and MINKIN S. Mammographic density: a hormonally responsive risk factor for breast cancer. *J. Br. Menopause Soc.*, 2006, 12(4):186-93.
- [6858] BOYD NF, GUO H, MARTIN LJ, SUN L, STONE J, FISHELL E, JONG RA, HISLOP G, CHIARELLI A, MINKIN S and YAFFE MJ. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2007, 356(3):227-36.
- [6859] BRISSON J, VERREAULT R, MORRISON AS, TENNINA S and MEYER F. Diet, mammographic features of breast tissue, and breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.*, 1989, 130(1):14-24.
- [6860] VACHON CM, KUSHI LH, CERHAN JR, KUNI CC and SELLERS TA. Association of diet and mammographic breast density in the Minnesota breast cancer family cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000, 9(2):151-60.
- [6861] NAGATA C, MATSUBARA T, FUJITA H, NAGAO Y, SHIBUYA C, KASHIKI Y and SHIMIZU H. Associations of mammographic density with dietary factors in Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, 14(12):2877-80.
- [6862] WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR, 2007.
- [6863] MAHAN LK and SCOTT-STUMP S. Krause's food & nutrition therapy. Saunders Elsevier, edition 12, 2008.
- [6864] KOCH MA. Experimental modeling and research methodology. In Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. and Franklin, C.L. (eds) "The laboratory rat". Elsevier, pp. 587-625, 2006.
- [6879] SOLANAS M, GRAU L, MORAL R, VELA E, ESCRICH R and ESCRICH E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21ras signalling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis*, 2010, 31(5):871-79.
- [6887] MORAL R, ESCRICH R, SOLANAS M, VELA E, COSTA I, RUÍZ DE VILLA MC and ESCRICH E. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats. *Nutr. Cancer*, 2011, 63(3):410-20.
- [6891] GOPAUL NK, ZACHAROWSKI K, HALLIWELL B and ANGGÅRD EE. Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F(2)-isoprostane levels. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 28(5):806-14.
- [6895] PERQUIN M, OSTER T, MAUL A, FROMENT N, UNTEREINER M and BAGREL D. The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2001, 127(6):368-74.
- [6897] BOSCH A, EROLES P, ZARAGOZA R, VIÑA JR, LLUCH A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.*, 2010, 36(3):206-15.
- [6898] HULKA BS, LIU ET and LININGER RA. Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer*, 1994, 74(3Suppl):S1111-S24.
- [6915] KRAMER F, JOHNSON IT, DOLEMAN JF and LUND EK. A comparison of the effects of soya isoflavonoids and fish oil on cell proliferation, apoptosis and the expression of oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the mammary gland and colon of the rat. *Br. J. Nutr.*, 2009, 102:29-36.
- [6918] BARTSCH H, NAIR J and OWEN RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999, 20(12):2209-18.
- [6920] SPEIRS V. The evolving role of oestrogen receptor beta in clinical breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2008, 10(5):111.
- [6921] LIU MM, ALBANESE C, ANDERSON CM, HILTY K, WEBB P, UHT RM, PRICE RH JR, PESTELL RG and KUSHNER PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(27):24353-60.
- [6922] FITZGERLAD K, HARRINGTON A and LEDER P. Ras pathway signals required for notch-mediated oncogenesis. *Oncogene*, 2000, 19:4191-98.
- [6963] HARTMAN J, STRÖM A and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor beta in breast cancer - Diagnostic and therapeutic implications. *Steroids*, 2009, 74:635-41.
- [6966] SKIN JH, HUR JY, SEO HS, JEONG YA, LEE JK, OH MJ, KIM T, SAW HS and KIMS H. The ratio of ER $\alpha$  to ER $\beta$  in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 2007, 72:592-99.

- [6967] MORANI A, WARNER M and GUSTAFSSON JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J. Intern. Med.*, 2008, 264(2):128-42.
- [6969] GAROFALO C, KODA M, CASCIO S, SULKOWSKA M, KANCZUGA-KODA L, GOLASZEWSKA J, RUSSO A, SULKOWSKI S and SURMACZ E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12:1447-53.
- [7022] ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358:1148-59.
- [7062] MUSGROVE EA and SUTHERLAND RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9:631-43.
- [7070] YAQOOB P and CALDER PC. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. *Br. J. Nutr.*, 2007, 98:S41-S45.
- [7071] YAQOOB P. Olive oil and immune function. En "Olive Oil and Health", QUILES JL, RAMIREZ-TORTOSA MC, YAQOOB P, CAB International, Oxfordshire, UK, 2006, pp. 265-83.
- [7086] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A and BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, 454:436-44.
- [7097] SOLANAS M, MORAL R, GARCÍA G, GRAU L, VELA E, ESCRICH R, COSTA I and ESCRICH E. Differential expression of H19 and vitamin D3 upregulated protein 1 as a mechanism of the modulatory effects of high virgin olive oil and high corn oil diets on experimental mammary tumours. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2009, 18:153-61.
- [7102] ROMAGUERA D, NORAT T, VERGNAUD AC *et al.* (51 authors). Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 92:912-21.
- [7108] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C and PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*, 2010, 127:2893-917.
- [7120] PEREZ-MARTINEZ P, LOPEZ-MIRANDA J, BLANCO-COLIO L, BELLIDO C, JIMENEZ Y, MORENO JA, DELGADO-LISTA J, EGIDO J and PEREZ-JIMENEZ F. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor  $\kappa$ B activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis*, 2007, 194:e141-e46.
- [7122] BELLIDO C, LOPEZ-MIRANDA J, BLANCO-COLIO LM, PEREZ-MARTINEZ P, MURIANA FJ, MARTÍN-VENTURA JL, MARÍN C, GÓMEZ P, FUENTES F, EGIDO J and PEREZ-JIMENEZ F. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 80:1487-91.
- [7144] SOTO-GUZMÁN A, NAVARRO-TITO N, CASTRO-SANCHEZ L, MARTINEZ-OROZCO R and SALAZAR EP. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2010, 27:505-15.
- [7145] MacLENNAN M and MA DWL. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2010, 12:211.
- [7149] DAVIDSON LA, WANG N, SHAH MS, LUPTON JR, IVANOV I and CHAPKIN RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding micro RNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, 2009, 30:2077-84.
- [7150] ALQUOBAILI F, MILLER SA, MUHIE S, DAY A, JETT M and HAMMAMIEH R. Estrogen receptor-dependent genomic expression profiles in breast cancer cells in response to fatty acids. *J. Carcinog.*, 2010, 4:8-17.
- [7151] SPENCER L, MANN C, METCALFE M, WEBB M, POLLARD C, SPENCER D, BERRY D, STEWARD W and DENNISON A. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur. J. Cancer*, 2009, 45:2077-86.
- [7152] DIMRI M, BOMMI PV, SAHASRABUDDHE AA, KHANDEKAR JD and DIMRI GP. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010, 31:489-95.
- [7154] HAMMAMIEH R, CHAKRABORTY N, MILLER SA, WADDY E, BARMADA M, DAS R, PEEL SA, DAY AA and JETT M. Differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007, 101:7-16.
- [7158] DICKSON RB, THOMPSON EW and LIPPMAN ME. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1990, 37:305-16.
- [7163] HARIKUMAR KB, SUNG B, THARAKAN ST, PANDEY MK, JOY B, GUHA S, KRISHNAN S and AGGARWAL BB. Sesamin manifests chemopreventive effects through the suppression of NF-kappa B-regulated cell survival, proliferation, invasion, and angiogenic gene products. *Mol. Cancer Res.*, 2010, 8:751-61.
- [7168] BORRELLI F and IZZO AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol.*, 2009, 23(1):33-49.
- [7177] FU J, ASTARITA G, GAETANI S, KIM J, CRAVATT BF, MACKIE K and PIOMELLI D. Food intake regulates Oleoylethanolamide formation and degradation in the proximal small intestine. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282:1518-28.

## Bibliografía

- [7178] RODRÍGUEZ DE FONSECA F, NAVARRO M, GÓMEZ R, ESCUREDO L, NAVA F, FU J, MURILLO-RODRÍGUEZ E, GIUFFRIDA A, LO VERME J, GAETANI S, KATHURLA S, GALL C and PIOMELLI D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 2001, 414(6860):209-12.
- [7179] FU J, GAETANI S, OVEISI F, LO VERME J, SERRANO A, RODRÍGUEZ DE FONSECA F, ROSENGARTH A, LUECKE H, DI GIACOMO B, TARZIA G and PIOMELLI D. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature*, 2003, 425(6953):90-93.
- [7180] LO VERME J, GUZMÁN M, GAETANI S and PIOMELLI D. Cold exposure stimulates synthesis of the bioactive lipid oleylethanolamide in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281:22815-18.
- [7206] THABUIS C, TISSOT-FAVRE D, BEZELGUES JB, MARTIN JC, CRUZ-HERNANDEZ C, DIONISI F and DESTAILLATS F. Biological functions and metabolism of oleylethanolamide. *Lipids*, 2008, 43:887-94.
- [7210] LO VERME J, GAETANI S, FU J, OVEISI F, BURTON K and PIOMELLI D. Regulation of food intake by oleylethanolamide. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62:708-16.
- [7211] GAETANI S, FU J, CASSANO T, *et al.* (13 authors). The fat-induced satiety factor oleylethanolamide suppresses feeding through central release of oxytocin. *J. Neurosci.*, 2010, 30:8096-101.
- [7212] GONZÁLEZ-YANES C, SERRANO A, BERMÚDEZ-SILVA FJ, HERNÁNDEZ-DOMINGUEZ M, PÁEZ-OCHOA MA, RODRÍGUEZ DE FONSECA F and SÁNCHEZ-MARGALET V. Oleylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2005, 289:E923-E29.
- [7218] SERRANO A, PAVÓN FJ, TOVAR S, CASANUEVA F, SEÑARÍS R, DIÉGUEZ C and RODRÍGUEZ DE FONSECA F. Oleylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology*, 2011, 60:593-601.
- [7249] MANTOVANI A. Cancer-related inflammation: the seventh hallmark of cancer. En "American Society of Clinical Oncology", ASCO Educational Book, 2009, 723-26.
- [7304] FIEGL H, MILLINGER S, MUELLER-HOLZNER E, MARTH C, ENSINGER C, BERGER A, KLOCKER H, GOEBEL G and WIDSCHWENDTER M. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.*, 2005, 65:1141-45.
- [7307] JOVANOVIĆ J, RONNEBERG JA, TOST J and KRISTENSEN V. The epigenetics of breast cancer. *Mol. Oncol.*, 2010, 4:242-54.
- [7310] MARTENS JWM, NIMMICH I, KOENIG T *et al.* (19 authors). Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res.*, 2005, 65:4101-17.
- [7318] WIDSCHWENDTER M, SIEGMUND KD, MÜLLER HM, FIEGL H, MARTH C, MÜLLER-HOLZNER E, JONES PA and LAIRD PW. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.*, 2004, 64:3807-13.
- [7349] HANAHAN D and WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-74.
- [7368] GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR and KARIN M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 2010, 140(6):883-99.
- [7371] DeNARDO DG and COUSSENS LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.*, 2007, 9:212.
- [7375] ESCRICH E, SOLANAS M, MORAL R and ESCRICH R. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 2011, 17(8):813-30.
- [7475] MOUSSAVI N, GAVINO V and RECEVEUR O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity?. *Obesity*, 2008, 16(1):7-15.
- [7482] PIERS LS, WALKER KZ, STONEY RM, SOARES MJ and O'DEA K. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. *Br. J. Nutr.*, 2003, 90(3):717-27.
- [7493] ESTRUCH R. Anti-inflammatory effects of Mediterranean diet: the experience of the Predimed study. *Proc. Nutr. Soc.*, 2010, 69(3):333-40.
- [7494] SHAI I, SCHWARZFUCHS D, HENKIN Y *et al.* (23 authors). Weight loss with a low-carbohydrate, mediterranean or low-fat diet. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 359:229-41.
- [7495] FU J, OVEISI F, GAETANI S, LIN E and PIOMELLI D. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR $\alpha$  agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, 2005, 48:1147-53.
- [7498] DIEHL AM and HOEK JB. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "*The benefits of losing control*". *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1999, 31:493-505.

- [7516] LEONHARDT M and LANGHANS W. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol. Behav.*, 2004, 83:645-51.
- [7519] SIEGEL R, NAISHADHAM D and JEMAL A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 2012, 62:10-29.
- [7520] RUSSO J, TAIT L and RUSSO IH. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 1983, 113(1):50-66.
- [7527] ATSHAVES BP, McINTOSH AL, STOREY SM, LANDROCK KK, KIER AB and SCHROEDER F. High dietary fat exacerbates weight gain and obesity in female liver fatty acid binding protein gene-ablated mice. *Lipids*, 2010, 45:97-100.
- [7528] FERRÉ P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors. Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2004, 53:S43-S50.
- [7529] DEMINICE R, DA SILVA RP, LAMARRE SG, BROWN C, FUREY GN, McCARTER SA, JORDAO AA, KELLY KB, KING-JONES K, JACOBS RL, BROSNAN ME and BROSNAN JT. Creatine supplementation prevents the accumulation of fat in the livers of rats fed a high-fat diet. *J. Nutr.*, 2011, 141(10):1799-804.
- [7530] LIAO FH, LIOU TH, SHIEH MJ and CHIEN YW. Effects of different ratios of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids on regulating body fat deposition in hamsters. *Nutrition*, 2010, 26:811-17.
- [7531] ATSHAVES BP, MARTIN GG, HOSTETLER, McINTOSH AL, KIER AB and SCHROEDER F. Liver fatty acid-binding protein and obesity. *J. Nutr. Biochem.*, 2010, 21(11):1015-32.
- [7532] VIAL G, DUBOCHAUD H, COUTURIER K, COTTET-ROUSSELLE C, TALEUX N, ATHIAS A, GALINIER A, CASTEILLA L and LEVERVE XM. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J. Hepatol.*, 2011, 54(2):348-56.
- [7533] ARMSTRONG MB and TOWLE HC. Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic ucp-2 expression via a PPAR $\alpha$ -mediated pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001, 281:E1197-E1204.
- [7534] RODRÍGUEZ VM, PORTILLO MP, PICÓ C, MACARULLA MT and PALOU A. Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle. *Am. J. Nutr.*, 2002, 75:213-20.
- [7535] CASTRO MC, MASSA ML, DEL ZOTTO H, GAGLIARDINO JJ and FRANCINI F. Rat liver uncoupling protein 2: changes induced by a fructose-rich diet. *Life Sci.*, 2011, 89:609-14.
- [7536] ENGELBREGT MJT, VAN WEISSENBRUCH MM, POPP-SNIJDERS C and DELEMARRE-VAN DE WAAL HA. Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *J. Endocrinol.*, 2002, 173(2):297-304.
- [7537] DONATO Jr J, CRAVO RM, FRAZAO R, GAUTRON L, SCOTT MM, LACHEY J, CASTRO IA, MARGATHO LO, LEE S, LEE C, RICHARDSON JA, FRIEDMAN J, CHUA Jr S, COPPARI R, ZIGMAN JM, ELMQUIST JK and ELIAS CF. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in kiss1 neurons. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121(1):355-68.
- [7538] CHRISTENSEN A, BENTLEY GE, CABRERA R, ORTEGA HH, PERFITO N, WU TJ and MICEVYCH P. Hormonal regulation of female reproduction. *Horm. Metab. Res.*, 2012, 44(8):587-91.
- [7539] HILAKIVI-CLARKE L. Mechanisms by which high maternal fat intake during pregnancy increases breast cancer risk in female rodent offspring. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1997, 46(2-3):199-214.
- [7540] BOZKURT KK and KAPUCUOGLU N. Investigation of immunohistochemical ER $\alpha$ , ER $\beta$  and ER $\beta$ cx expressions in normal and neoplastic breast tissues. *Pathol. Res. Pract.*, 2012, 208(3):133-39.
- [7541] JARDÉ T, PERRIER S, VASSON MP and CALDEFIE-CHÉZET F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 2011, 47(1):033-43.
- [7542] JEONG YJ, BONG JG, PARK SH, CHOI JH and OH HK. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma *in situ* and invasive breast cancer. *J. Breast Cancer*, 2011, 14(2):96-103.
- [7543] YIN KB, NAJIMUDIN N and MUHAMMAD TST. The PPAR $\gamma$  coding region and its role in visceral obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 371(2):177-79.
- [7544] GUERRE-MILLO M. Extending the glucose / fatty acid cycle: a glucose / adipose tissue cycle. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31:1161-64.
- [7545] ABBOT BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR $\alpha$ ), beta (PPAR $\beta$ ), and gamma (PPAR $\gamma$ ) in rodent and human development. *Reprod. Toxicol.*, 2009, 27(3-4):246-57.
- [7546] GROSSMANN ME, RAY A, DOGAN S, MIZUNO NK and CLEARY MP. Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth. *Cell Res.*, 2008, 18(11):1154-56.

- [7547] TÖRÜNER F, AKBAY E, ÇAKIR N, SANCAK B, ELBEG S, TANERI F, AKTÜR M, KARAKOÇ A, AYVAZ G and ARSLAN M. Effects of PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists on serum leptin levels in diet-induced obese rats. *Horm. Metab. Res.*, 2004, 36(4):226-30.
- [7548] LOPEZ IP, MILAGRO FI, MARTI A, MORENO-ALIAGA MJ, MARTINEZ JA and DE MIGUEL C. High-fat feeding period affects gene expression in rat white adipose tissue. *Mol. Cell Biochem.*, 2005, 275(1-2):109-15.
- [7549] CLEARY MP, RAY A, ROGOZINA OP, DOGAN S and GROSSMANN ME. Targeting the adiponectin:leptin ratio for postmenopausal breast cancer prevention. *Front. Biosci (Schol. Ed.)*, 2009, 1:329-57.
- [7550] GONZALEZ RR, CHERFILS S, ESCOBAR M, YOO JH, CARINO C, STYER AK, SULLIVAN BT, SAKAMOTO H, OLAWAIYE, SERIKAWA T, LYNCH MP and RUEDA BR. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2). *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(36):26320-28.
- [7551] BARB D, PAZAITOU-PANAYIOTOU K and MANTZOROS CS. Adiponectin: a link between obesity and cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2006, 15(8):917-33.
- [7552] BONFIGLIO D, GABRIELE S, AQUILA S, CATALANO S, GENTILE M, MIDDEA E, GIORDANO F and ANDÓ S. Estrogen receptor  $\alpha$  binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  signaling in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11(17):6139-47.
- [7553] CHANDRAN M, PHILLIPS SA, CIARALDI T and HENRY RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. *Diabetes Care*, 2003, 26(8):2442-50.
- [7554] RUSSO J and RUSSO IH. Animal models for human breast cancer. *Molecular basis of breast cancer. Prevention and Treatment*. Ed. Springer, 2004, 181-226.
- [7574] CATALÁ A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “fluid mosaic model” to the “lipid whisker model”. *Biochimie.*, 2012, 94:101-09.
- [7599] SHIGENAGA MK, ABOUJAUDE EN, CHEN Q and AMES BN. Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.*, 1994, 234:16-33.
- [7600] HALLIWELL B and DIZDAROGLU M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic. Res. Commun.*, 1992, 16:75-87.
- [7601] VIDYULLATHA P, SIVA PRASAD B, SANDHYA DEVI G, PARDHANANDANA REDY P and HEMA PRASAD M. Assessment of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxuguanosine and malondialdehyde levels as oxidative stress markers and antioxidant status in non-small cell lung cancer. *Biomarkers*, 2012, 17:261-68.
- [7616] RUDEL RA, FENTON SE, ACKERMAN JM, EULING SY and MAKRIS SL. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ. Health Perspect.*, 2011, 119:1053-61.
- [7617] SCHEDIN P. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6:281-91.
- [7618] LI XF, LIN YS, KINSEY-JONES JS and O'BYRNE KT. High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats. *Endocrinology*, 2012, 153:4422-31.
- [7619] PINILLA L, AGUILAR E, DIEGUEZ C MILLAR RP and TENA-SEMPERE M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 2012, 92:1235-316.
- [7620] DA SILVA FARIA T, DA FONTE RAMOS C and SAMPAIO FJB. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15:123-27.
- [7621] IWASA T, MATSUZAKI T, MURAKAMI M, FUJISAWA S, KINOUCI R, GERELTSETSEG G, KUWAHARA A, YASUI T and IRAHARA M. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. *J. Physiol.*, 2010, 588.5:821-29.
- [7622] JARDÉ T, CALDEFIE-CHÉZET F, DAMEZ M, MISHELLANY F, PENAULT-LLORCA F, GUILLOT J and VASSON MP. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2008, 19:905-11.
- [7624] EVANS RM, BARISH GD and WANG YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.*, 2004, 10:355-61.
- [7625] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, GARCÍA-ARELLANO A, TOLEDO E *et al* (21 authors). A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PlosONE*, 2012, 7:e43134.
- [7627] PARSA P and PARSA B. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asoc. Pac. J. Cancer Prev.*, 2009, 10:545-50.
- [7628] HALÁSZ B, KÖVES K, MOLNÁR J, BALIKA K, STOLL V and KOVÁCS G. Hypothalamus and puberty. *Brain Res. Bull.*, 1988, 20:709-12.

- [7629] MAEDA KI, OHKURA S, UENOYAMA Y, WAKABAYASHI Y, OKA Y, TSUKAMURA H and OKAMURA H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.*, 2010, 1364:103-15.
- [7630] SANTORO N, FILICORI M and CROWLEY WF. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.*, 1986, 7:11-23.
- [7631] KELCH RP, HOPWOOD NJ, SAUDER S and MARSHALL JC. Evidence for decreased secretion of gonadotropin-releasing hormone in pubertal boys during short-term testosterone treatment. *Pediatr. Res.*, 1985, 19:112-17.
- [7632] BELCHETZ PE, PLANT TM, NAKAI Y, KEOGH EJ and KNOBIL E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 1978, 202:631-33.
- [7633] TERASAWA E, KURIAN JR, GUERREIRO KA, KENEALY BP, HUTZ ED and KEEN KL. Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J. Neuroendocrinol.*, 2010, 22:630-38.
- [7634] SISK CL, RICHARDSON HN, CHAPPELL PE and LEVINE JE. In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. *Endocrinology*, 2001, 142:2929-36.
- [7635] IRWING MS, FRALEY GS, SMITH JT, ACOHIDO BV, POPA SM, CUNNINGHAM MJ, GOTTSCH ML, CLIFTON DK and STEINER RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of kiss-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 2004, 80:264-72.
- [7636] MUIR AI, CHAMBERLAIN L, ELSHOURBAGY NA *et al.* (23 authors). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide kiss-1. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:28969-75.
- [7637] OJEDA SR, LOMNICZI A and SANDAU US. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.*, 2008, 20:732-42.
- [7638] AMSTALDEN M, COOLEN LM, HEMMERLE AM, BILLINGS HJ, CONNORS JM, GOODMAN RL and LEHMAN MN. Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J. Neuroendocrinol.*, 2009, 22:1-12.
- [7639] CLARKSON J, BOON WC, SIMPSON ER and HERBISON AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*, 2009, 150:3214-20.
- [7640] CLARKSON J, d'ANGLEMONT DE TASSIGNY X, COLLEDGE WH, CARATY A and HERBISON AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J. Neuroendocrinol.*, 2009, 21:673-82.
- [7641] CLARKSON J and HERBISON AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 2006, 147:5817-25.
- [7642] GILL JC, WANG O, KAKAR S, MARTINELLI E, CARROL RS and KAISER UB. Reproductive hormone-dependent and -independent contributions to developmental changes in kisspeptin in GnRH-deficient hypogonadal mice. *PLoS ONE*, 2010, 5:e11911.
- [7643] KRAJEWSKI SJ, ANDERSON MJ, ILES-SHIH L, CHEN KJ, URBANSKI HF and RANCE NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J. Comp. Neurol.*, 2005, 489:372-86.
- [7644] LEHMAN MN, COOLEN LM and GOODMAN RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 2010, 151:3479-89.
- [7645] MAYER C, ACOSTA-MARTINEZ M, DUBOIS SL, WOLFE A, RADOVICK S, BOEHM U and LEVINE JE. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor  $\alpha$ -signaling in kisspeptin neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107:22693-98.
- [7646] NAVARRO VM, GOTTSCH ML, CHAVKIN C, OKAMURA H, CLIFTON DK and STEINER RA. Regulation of gonadotropin-releasing secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J. Neurosci.*, 2009, 29:11859-66.
- [7647] NAVARRO VM, GOTTSCH ML, WU M *et al.* (15 authors). Regulation of NKB pathways and their roles in the control of kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology*, 2011, 152:4265-75.
- [7648] SMITH JT, CUNNINGHAM MJ, RISSMAN EF, CLIFTON DK and STEINER RA. Regulation of kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 2005, 146:3686-92.
- [7649] SMITH JT, DUNGAN HM, STOLL EA, GOTTSCH ML, BRAUN RE, EACKER SM, CLIFTON DK and STEINER RA. Differential regulation of kiss1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, 2005, 146:2976-84.
- [7650] TAKASE K, UENOYAMA Y, INOUE N *et al.* (13 authors). Possible role of oestrogen in pubertal increase of kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J. Neuroendocrinol.*, 2009, 21:527-37.

## Bibliografia

- [7651] WAKABAYASHI Y, NAKADA T, MURATA K *et al.* (12 authors). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.*, 2010, 30:3124-32.
- [7652] YEO SH and HERBISON AE. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology*, 2011, 152:2387-99.
- [7653] CHRISTIAN CA and MOENTER SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr. Rev.*, 2010, 31:544-77.
- [7654] GROSSMANN ME and CLEARY MP. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis – focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie*, 2012, 94:2164-71.
- [7655] LORINCZ AM and SUKUMAR S. Molecular link between obesity and breast cancer. *Endocr. Rel. Cancer*, 2006, 13:279-92.
- [7656] AHIMA RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 2006, 5:242S-48S.
- [7657] SOMASUNDAR P, McFADDEN DW, HILEMAN SM and VONA-DAVIS L. Leptin is a growth factor in cancer. *J. Surg. Res.*, 2004, 116:337-49.
- [7658] MICHALAKIS K, MINTZIORI G, KAPRARA A, TARLATZIS BC and GOULIS DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 2012, 62:457-78.
- [7659] TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X *et al.* (19 authors). Identification and expression cloning of a leptin receptor, ObR. *Cell*, 1995, 83:1263-71.
- [7660] EBENBICHLER CF, KASER S, LAIMER M, WOLF HJ, PATSCH JR and ILLSLEY NP. Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human term placenta. *Placenta*, 2002, 23:516-21.
- [7661] KITAWAKI J, KOSHIBA H, ISHIHARA H, KUSUKI I, TSUKAMOTO K and HONJO H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85:1946-50.
- [7662] TSUCHIYA T, SHIMIZU H, HORIE T and MORI M. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur. J. Pharmacol.*, 1999, 365:273-79.
- [7663] ISHIKAWA M, KITAYAMA J and NAGAWA H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10:4325-31.
- [7664] GERELTSETSEG G, MATSUZAKI T, IWASA T, KINOUCI R, NAKAZAWA H, YAMAMOTO S, KUWAHARA A, YASUI T and IRAHARA M. Delay in the onset of puberty of intrauterine growth retarded female rats cannot be rescued with hypernutrition after birth. *Endocr. J.*, 2012, 59:963-72.
- [7665] KIM S and MOUSTAID-MOUSSA N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J. Nutr.*, 2000, 130:3110S-15S.
- [7666] ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N *et al.* (19 authors). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 425:560-64.
- [7667] WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, HOTTA K, MATSUZAWA Y, PRATLEY RE and TATARANI PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86:1930-35.
- [7668] KNERR I, SCHUSTER S, NOMIKOS P, BUCHFELDER M, DÖTSCH J, SCOOFF E, FAHLBUSCH R and RASCHER W. Gene expression of adrenomedullin, leptin, their receptors and neuropeptide Y in hormone-secreting and non-functioning pituitary adenomas, meningiomas and malignant intracranial tumours in humans. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2001, 27:215-22.
- [7669] WANG XJ, YUAN SL, LU Q, LU YR, ZHANG J, LIU Y and WANG WD. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2004, 10:2478-81.
- [7670] MANTZORORS C, PETRIDOU E, DESSYPRIS N, CHAVELAS C, DALAMAGA M, ALEXE DM, PAPADIAMANTIS Y, MARKOPOULOS C, SPANOS E, CHROUSOS G and TRICHOPOULOS D. Adiponectin and breast cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89:1102-07.
- [7671] RUSSO J and RUSSO IH. Development of the human breast. *Maturitas*, 2004, 49:2-15.
- [7672] POLLÁN M, PASTOR-BARRIUSO R, ARDANAZ E *et al.* (28 authors). Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, 101:1584-91.
- [7673] BORRÀS J, AMEIJIDE A, VILARDELL L, VALLS J, MARCOS-GRAGERA R and IZQUIERDO A. Trends in cancer incidence in Catalonia, 1985-2002. *Med. Clin. (Barc.)*, 2008, 131Suppl1:11-18.
- [7674] MARCOS-GRAGERA R, CARDÓ X, GALCERAN J, RIBES J, IZQUIERDO A and BORRÀS J. Cancer incidence in Catalonia, 1998-2002. *Med. Clin. (Barc.)*, 2008, 131Suppl1:04-10.

- [7675] TERRY PD and ROHAN TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, 11:953-71.
- [7676] GRAY J, EVANS N, TAYLOR B, RIZZO J and WALKER M. State of the evidence. The connection between breast cancer and the environment. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 2009, 15:43-78.
- [7677] DIVISI D, DI TOMMASO S, SALVEMINI S, GARRAMONE M and CRISCI R. Diet and cancer. *Acta Biomed.*, 2006, 77:118-23.
- [7678] BRODY JG and RUDEL RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, 2003, 111:1007-19.
- [7679] CABARAVDIC M. Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer. *Med. Arh.*, 2006, 60(6 Suppl.):97-100.
- [7681] QIN XY, ZAHA H, NAGANO R, YOSHINAGA J, YONEMOTO J and SONE H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol. Lett.*, 2011, 206:152-57.
- [7682] ARTANDI SE and DEPINHO RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 2010, 31:9-18.
- [7683] FREED-PASTOR WA and PRIVES C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.*, 2012, 26:1268-86.
- [7684] NELSON BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.*, 2008, 222:101-16.
- [7685] FERRONE C and DRANOFF G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28:4045-51.
- [7686] BINDEA G, MLECNIK B, FRIDMAN WH, PAGÈS F and GALON J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, 22:215-22.
- [7687] LYNCH HT, SNYDER C and LYNCH J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann. Surg. Oncol.*, 2012, 19:1723-31.
- [7688] LEE EYHP and MULLER WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, 2:a003236.
- [7689] MILLER WR. Aromatase and the breast: regulation and clinical aspects. *Maturitas*, 2006, 54:335-41.
- [7692] WILLET WC. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol. Sci.*, 1999, 52:S127-S46.
- [7693] YANG L, PANG Y and MOSES HL. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 2010, 31:220-27.
- [7694] SHIELDS JD, KOURTIS IC, TOMEI AA, ROBERTS JM and SWARTZ MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 2010, 328:749-52.
- [7695] DE NARDO DG, ANDREU P and COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29:309-16.
- [7696] QIANBZ and POLLARDJW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010, 141:39-51.
- [7697] KARNOUB AE and WEINBERG RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.*, 2006-2007, 26:75-85.
- [7698] DeBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G and THOMPSON CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, 2008, 7:11-20.
- [7699] HSU PP and SABATINI DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 2008, 134:703-07.
- [7700] JONES RG and THOMPSON CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.*, 2009, 23:537-48.
- [7701] DIGIOVANNI J and JUCHAU MR. Biotransformation and bioactivation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (7,12-DMBA). *Drug Metab. Rev.*, 1980, 11:61-101.
- [7708] OSTRAKHOVITCH EA. Redox environment and its meaning for breast cancer cells fate. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2011, 11:479-95.
- [7711] ESCRICH E, MORAL R and SOLANAS M. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet, and breast cancer. *Public Health Nutr.*, 2011, 14:2323-32.
- [7715] LAMAS O, GARCÍA-AMIGO F, MARTI A, MORENO-ALIAGA MJ, BANDRÉS E, GARCÍA-FONCILLAS J and MARTÍNEZ JA. Análisis del patrón de expresión génica en tejido adiposo de individuos obesos y controles. *Rev. Esp. Obes.*, 2005, 3:40-46.
- [7716] FLOWERS M, SCHROEDER JA, BOROWSKY AD, BESSELSSEN DG, THOMPSON CA, PANDEY R and THOMPSON PA. Pilot study on the effects of dietary conjugated linoleic acid on tumorigenesis and gene expression in PyMT transgenic mice. *Carcinogenesis*, 2010, 31:1642-49.

## Bibliografia

- [7717] KIM HK, CHOI S and CHOI H. Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding  $\alpha$ -linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15:485-92.
- [7718] FERRAMOSCA A, SAVY V and ZARA V. Olive oil increases the hepatic triacylglycerol content in mice by a distinct influence on the synthesis and oxidation of fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008, 72:62-69.
- [7719] ELETTO D, LEONE A, BIFULCO M and TECCE MF. Effect of unsaturated fat intake from Mediterranean diet on rat liver mRNA expression profile: selective modulation of genes involved in lipid metabolism. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2005, 15:13-23.
- [7720] PRIORE P, STANCA E, GNONI GV and SICULELLA L. Dietary fat types differently modulate the activity and expression of mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1821:1341-49.
- [7721] MACH N, JACOBS AAA, KRUIJT L, VAN BAAL J and SMITS MA. Alteration of gene expression in mammary gland tissue of dairy cows in response to dietary unsaturated fatty acids. *Animal*, 2011, 5:1217-30.
- [7722] DEDEURWAERDER S and FUKS F. DNA methylation markers for breast cancer prognosis. *Oncoimmunology*, 2012, 1:962-64.
- [7723] MISRA Y, BENTLEY PA, BOND JP, TIGHE S, HUNTER T and ZHAO FQ. Mammary gland morphological and gene expression changes underlying pregnancy protection of breast cancer tumorigenesis. *Physiol. Genomics*, 2012, 44:76-88.
- [7724] COMBA A, MAESTRI DM, BERRA MA, GARCIA CP, DAS UN, EYNARD AR and PASQUALINI ME. Effect of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis.*, 2010, 9:112.
- [7726] ROONGTA UV, PABALAN JG, WANG X *et al* (12 authors). Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol. Cancer Res.*, 2011, 9:1551-61.
- [7727] IGAL RA. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*, 2010, 31:1509-15.
- [7728] ZIMMERMAN AW and VEERKAMP JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002, 59:1096-116.
- [7729] NTAMBI JM, MIYAZAKI M, STOEHR JP, LAN H, KENDZIORSKI CM, YANDELL BS, SONG Y, COHEN P, FRIEDMAN JM and ATTIE AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99:11482-86.
- [7730] HOLDER AM, GONZALEZ-ANGULO AM, CHEN H, AKCAKANAT A, DO KA, SYMMANS WF, PUSZTAI L, HORTOBAGYI GN, MILLS GB and MERIC-BERNSTAM F. High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2013, 137:319-27.
- [7731] MacDONALD MLE, VAN ECK M, HILDEBRAND RB *et al* (15 authors). Despite antiatherogenic metabolic characteristics, SCD1-deficient mice have increased inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009, 29:341-47.
- [7733] JACOBS AAA, VAN BAAL J, SMITS MA, TAWHEEL HZH, HENDRIKS WH, VAN VUUREN AM and DIJKSTRA J. Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2011, 94:874-87.
- [7734] YANG Y, SPITZER E, KENNEY N *et al* (13 authors). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J. Cell Biol.*, 1994, 127:1097-109.
- [7735] HYDER A, ZENHOM M, KLAPPER M, HERRMANN J and SCHREZENMEIR J. Expression of fatty acid binding proteins 3 and 5 genes in rat pancreatic islets and INS-1E cells. *Islets*, 2010, 2:174-84.
- [7736] NEVO J, MAI A, TUOMI S, PELLINEN T, PENTIKÄINEN OT, HEIKKILÄ P, LUNDIN J, JOENSUU H, BONO P and IVASKA J. Mammary-derived growth inhibitor (MDGI) interacts with integrin  $\alpha$ -subunits and suppresses integrin activity and invasion. *Oncogene*, 2010, 29:6452-63.
- [7737] NEVO J, MATTILA E, PELLINEN T *et al* (12 authors). Mammary-derived growth inhibitor alters traffic of EGFR and induces a novel form of cetuximab resistance. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15:6570-81.
- [7738] LI H, LÜ Q, XUE H, DONG LH and YANG HJ. Gene expression of H-FABP and FAS and its clinicopathological significance in breast infiltrating ductal carcinoma. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban*, 2008, 39:615-18.
- [7739] SHEARER J, FUEGER PT, BRACY DP, WASSERMAN DH and ROTTMAN JN. Partial gene deletion of heart-type fatty acid-binding protein limits the severity of dietary-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2005, 54:3133-39.
- [7740] CALLAHAN R and EGAN SE. Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2004, 9:145-63.
- [7741] SUN Y, LOWTHER W, KATO K *et al* (13 authors). Notch4 intracellular domain binding to smad3 and inhibition of the TGF- $\beta$  signaling. *Oncogene*, 2005, 24:5365-74.

- [7742] LEE J, SCHRAWAT A and SINGH SV. Withaferin A causes activation of notch2 and notch4 in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 136:45-56.
- [7743] HARRISON H, FARNIE G, HOWELL SJ, ROCK RE, STYLIANOU S, BRENNAN KR, BUNDRED NJ and CLARKE RB. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the notch4 receptor. *Cancer Res.*, 2010, 70:709-18.
- [7744] EGLOFF AM and GRANDIS JR. Molecular pathways: context-dependent approaches to notch targeting as cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2012, 18:5188-95.
- [7745] LEONG KG and KARSAN A. Recent insights into the role of notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, 2006, 107:2223-33.
- [7746] MacKENZIE F, DURIEZ P, WONG F, NOSEDA M and KARSAN A. Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jk-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279:11657-63.
- [7747] NTAMBI JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.*, 1999, 40:1549-58.
- [7748] SINGH K, HARTLEY DG, McFADDEN TB and MACKENZIE DD. Dietary fat regulates mammary stearoyl-CoA desaturase expression and activity in lactating mice. *J. Dairy Res.*, 2004, 71:1-6.
- [7749] YAMASHITA H, WANG Z, WANG Y, SEGAWA M, KUSUDO T and KONTANI Y. Induction of fatty acid-binding protein 3 in brown adipose tissue correlates with increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 377:632-35.
- [7751] COSTA I, MORAL R, SOLANAS M, ANDREU FJ, RUIZ DE VILLA MC and ESCRICH E. High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study. *Virchows Arch.*, 2011, 458:141-51.
- [7752] CURIGLIANO G. Immunity and autoimmunity: revising the concepts of response to breast cancer. *The Breast*, 2011, S3:S71-S74.
- [7753] MOUGIAKAKOS D, CHOUDHURY A, LLADSER A, KIESSLING R and JOHANSSON CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.*, 2010, 107:57-117.
- [7754] OSTRAND-ROSENBERG S and SINHA P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.*, 2009, 182:4499-506.
- [7755] SÁNCHEZ-FIDALGO S, VILLEGAS I, CÁRDENO A, TALERO E, SÁNCHEZ-HIDALGO M, MOTILVA V and ALARCÓN DE LA LASTRA C. Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Clin. Nutr.*, 2010, 29:663-73.
- [7756] QUINTÁS-CARDAMA A and VERSTOVSEK S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin. Cancer Res.*, 2013, Epub ahead of print.
- [7757] MAROTTA LLC, ALMENDRO V, MARUSYK A *et al.* (28 authors). The JAK2/STAT3 signalling pathway is required for growth of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121:2723-35.
- [7758] HARRY BL, ECKHARDT SG and JIMENO A. JAK2 inhibition for the treatment of hematologic and solid malignancies. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2012, 21:637-55.
- [7759] SCOLLEN S, LUCCARINI C, BAYNES C *et al.* (13 authors). TGF- $\beta$  signalling pathway and breast cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2011, 20:1112-19.
- [7760] SHARMA P, PATEL D and CHAUDHARY J. Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates Cdkn1B. *Cancer Med.*, 2012, 1:187-97.
- [7761] OZDEMIR F, ALTINISIK J, KARATEKE A, COKSUER H and BUYRU N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp. Ther. Med.*, 2012, 4:1092-96.
- [7762] CHEN KM, STEPHEN JK, RAJU U and WORSHAM MJ. Delineating and epigenetic continuum for initiation, transformation and progression to breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2011, 3:1580-92.
- [7764] IRIZARRY RA, HOBBS B, COLLIN F, BEAZER-BARCLAY YD, ANTONELLIS KJ, SCHERF U and SPEED TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 2003, 4:249-64.
- [7765] SMYTH GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, 2004, 3: article 3.
- [7766] BENJAMINI Y and HOCHBERG Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B.*, 2005, 1:289-300.
- [7767] GENTLEMAN R, CAREY V, HUBER W, IRIZARRY R and DUDOIT S. Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor. Ed. Springer Science Business Media Inc., 2005.

## *Bibliografía*

- [7786] ROSSOUW JE, ANDERSON GL, PRENTICE RL *et al.* (12 authors). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*, 2002, 288:321-33.
- [7787] KAHLENBORN C, MODUGNO F, POTTER DM and SEVERS WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.*, 2006, 81:1290-302.
- [7789] DAS SK and HOEFLER G. The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. *Trends Mol. Med.*, 2013, 19:292-301.

**ANEXO**



**ANEXO TABLA 1. Índices de masa corporal en función de la dieta a diferentes edades.** Índice de Lee e Índice de Masa Corporal. n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	Índice de Lee				Índice de Masa Corporal			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	314.38	310.71	8.75	2.82	0.47	0.47	0.04	8.81
	M <sub>IP</sub>	6	307.59	313.16	12.44	3.97	0.46	0.48	0.04	8.08
	O <sub>IP</sub>	6	307.97	307.09	7.91	2.57	0.46	0.46	0.02	5.30
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	313.71	313.31	8.74	2.79	0.57	0.57	0.03	5.97
	M <sub>IP</sub>	6	313.31	314.89	6.09	1.93	0.57	0.58	0.04	7.51
	O <sub>IP</sub>	6	307.56	309.14	6.83	2.21	0.56	0.56	0.03	5.79
100 días	C	5	314.75	312.31	4.52	1.45	0.63	0.64	0.03	4.82
	M <sub>IP</sub>	5	312.46	312.12	4.70	1.51	0.64	0.64	0.02	3.79
	M <sub>P</sub>	5	314.03	313.35	8.57	2.74	0.63	0.64	0.05	7.60
	O <sub>IP</sub>	5	312.58	315.30	10.30	3.27	0.64	0.66	0.06	9.13
	O <sub>P</sub>	5	306.46	308.18	5.14	1.67	0.61	0.62	0.02	3.95
246 días	C	18	305.11	305.91	17.36	5.68	0.65	0.66	0.08	12.81
	M <sub>IP</sub>	19	323.05	322.09	22.75	7.06	0.74	0.76	0.14	18.08
	M <sub>P</sub>	18	304.49	310.06	17.38	5.61	0.65	0.69	0.11	16.46
	O <sub>IP</sub>	18	310.60	311.65	19.55	6.27	0.67	0.69	0.10	14.74
	O <sub>P</sub>	19	308.55	311.83	19.57	6.28	0.69	0.69	0.10	14.31

**ANEXO TABLA 2. Expresión relativa del ARNm de PPAR $\alpha$  y CPT-1a en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	PPAR $\alpha$				CPT-1a			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	2.09	2.14	0.64	29.88	5.92	6.87	3.65	53.06
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	1.43	1.46	0.14	9.27	1.95	2.03	1.14	55.94
	M <sub>IP</sub>	6	1.78	1.78	0.57	32.06	5.17	5.11	2.00	39.17
	O <sub>IP</sub>	6	1.69	1.73	0.35	20.15	4.85	5.05	1.57	31.02
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	1.37	1.27	0.36	28.27	0.95	2.67	3.24	121.11
	M <sub>IP</sub>	6	1.60	1.56	0.16	10.32	3.81	4.18	1.08	25.94
	O <sub>IP</sub>	6	1.44	1.41	0.16	11.48	4.73	5.20	2.03	39.05
100 días	C	5	1.04	1.12	0.37	33.04	1.66	2.59	1.89	73.08
	M <sub>IP</sub>	5	1.75	1.88	0.65	34.50	8.55	7.94	2.73	34.36
	M <sub>P</sub>	5	1.51	1.84	0.62	33.51	5.84	7.27	4.66	64.07
	O <sub>IP</sub>	5	2.33	1.97	0.65	32.75	7.09	7.32	2.44	33.36
	O <sub>P</sub>	5	2.01	2.05	0.21	10.33	6.94	7.48	1.44	19.21
246 días	C	10	2.30	2.44	1.09	44.43	2.51	3.27	2.02	61.67
	M <sub>IP</sub>	10	2.88	2.94	0.39	13.19	7.66	8.71	3.30	37.88
	M <sub>P</sub>	10	2.90	3.01	1.02	34.03	5.42	7.74	5.44	70.35
	O <sub>IP</sub>	10	2.65	2.86	1.35	47.30	4.22	5.27	3.25	61.76
	O <sub>P</sub>	10	2.26	2.52	1.05	41.70	5.16	5.76	2.15	37.34

**ANEXO TABLA 3. Expresión relativa del ARNm de L-FABP y UCP-2 en muestras de hígado de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	L-FABP				UCP-2			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	11.89	12.28	2.71	22.05	0.25	0.27	0.04	15.82
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	18.81	19.16	10.55	55.06	0.25	0.24	0.03	13.35
	M <sub>IP</sub>	6	26.86	29.64	11.97	40.39	0.26	0.28	0.05	18.41
	O <sub>IP</sub>	6	29.46	30.89	4.73	15.30	0.41	0.39	0.07	17.16
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	25.04	25.78	10.81	41.94	0.31	0.29	0.13	43.10
	M <sub>IP</sub>	6	36.93	37.46	5.23	13.97	0.32	0.31	0.04	13.81
	O <sub>IP</sub>	6	39.18	41.93	11.22	26.75	0.35	0.34	0.07	20.40
100 días	C	5	21.90	21.70	5.24	24.16	0.17	0.20	0.12	57.46
	M <sub>IP</sub>	5	41.42	44.06	7.47	16.95	0.28	0.26	0.04	16.52
	M <sub>P</sub>	5	39.12	40.03	2.05	5.13	0.29	0.30	0.057	18.75
	O <sub>IP</sub>	5	44.46	43.60	7.75	17.77	0.24	0.23	0.05	19.67
	O <sub>P</sub>	5	50.94	50.11	9.15	18.26	0.35	0.35	0.10	28.53
246 días	C	10	13.48	14.56	4.61	31.65	0.30	0.30	0.08	27.54
	M <sub>IP</sub>	10	21.63	20.59	5.20	25.26	0.40	0.49	0.28	58.48
	M <sub>P</sub>	10	20.44	19.72	5.31	26.94	0.33	0.37	0.20	54.34
	O <sub>IP</sub>	10	22.64	21.44	6.92	32.26	0.38	0.49	0.25	50.93
	O <sub>P</sub>	10	18.84	18.86	5.68	30.14	0.49	0.45	0.17	37.85

**ANEXO TABLA 4. Expresión relativa del ARNm de Kisspeptina y GPR54 en hipotálamo de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	Kisspeptina				GPR54			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		3	0.00	0.01	0.01	158.59	0.02	0.02	0.01	39.64
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	5	0.02	0.03	0.03	104.91	0.02	0.02	0.01	34.81
	M <sub>IP</sub>	6	0.04	0.03	0.02	47.73	0.02	0.02	0.00	23.15
	O <sub>IP</sub>	3	0.05	0.03	0.03	87.36	0.02	0.01	0.01	67.70
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	5	0.08	0.09	0.04	49.60	0.03	0.03	0.01	34.79
	M <sub>IP</sub>	5	0.12	0.12	0.11	90.71	0.03	0.03	0.01	24.24
	O <sub>IP</sub>	4	0.18	0.17	0.04	21.51	0.04	0.04	0.01	20.23
100 días	C	5	0.12	0.16	0.11	68.47	0.04	0.05	0.01	29.67
	M <sub>IP</sub>	4	0.06	0.07	0.06	87.18	0.04	0.04	0.01	14.64
	M <sub>P</sub>	4	0.07	0.10	0.08	81.01	0.04	0.04	0.02	58.04
	O <sub>IP</sub>	3	0.08	0.07	0.03	41.38	0.03	0.03	0.01	38.35
	O <sub>P</sub>	4	0.11	0.13	0.12	92.24	0.04	0.04	0.01	24.07

**ANEXO TABLA 5. Detección por *Western Blot* de los niveles de Leptina en plasma y expresión relativa del ARNm de ObR en hipotálamo de los grupos experimentales en edad peripuberal.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	Leptina - Plasma					GPR54				
		n	m	M	DS	CV	n	m	M	DS	CV
36 días	C+M <sub>p</sub> +O <sub>p</sub>	3	8.76	9.12	4.32	47.36	5	0.04	0.05	0.02	32.47
	M <sub>IP</sub>	3	11.23	12.53	3.36	26.80	6	0.05	0.05	0.01	15.76
	O <sub>IP</sub>	3	9.73	12.67	10.20	80.50	3	0.04	0.06	0.03	57.12
51 días	C+M <sub>p</sub> +O <sub>p</sub>	3	28.50	26.56	7.05	26.56	5	0.05	0.05	0.01	21.15
	M <sub>IP</sub>	3	18.60	18.60	5.42	29.16	5	0.09	0.08	0.03	40.05
	O <sub>IP</sub>	3	6.97	8.53	7.46	87.38	4	0.06	0.06	0.01	22.11

**ANEXO TABLA 6. Niveles plasmáticos de LH y FSH de los grupos experimentales en edad peripuberal.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	LH - Plasma				FSH -Plasma			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		1	0.82	0.82	-	-	7.05	7.05	-	-
36 días	C+M <sub>p</sub> +O <sub>p</sub>	5	0.24	0.69	1.02	147.28	2.97	3.63	2.60	71.70
	M <sub>IP</sub>	6	0.20	0.23	0.12	52.04	2.59	2.46	0.76	31.04
	O <sub>IP</sub>	6	0.20	0.24	0.13	53.36	3.05	3.08	0.54	17.49
51 días	C+M <sub>p</sub> +O <sub>p</sub>	6	0.39	0.36	0.09	24.10	3.03	2.75	0.89	32.26
	M <sub>IP</sub>	6	0.38	0.36	0.15	40.96	3.11	4.24	2.71	63.86
	O <sub>IP</sub>	6	0.39	3.76	8.24	219.26	3.39	4.37	2.21	50.47

**ANEXO TABLA 7. Niveles plasmáticos de Estradiol y Progesterona de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	Estradiol - Plasma					Progesterona - Plasma				
		n	m	M	DS	CV	n	m	M	DS	CV
24 días		2	6.30	6.30	1.13	17.96	6	3.90	3.63	1.42	38.95
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	2	12.40	12.40	8.06	65.01	6	9.65	9.80	3.81	38.92
	M <sub>IP</sub>	0	-	-	-	-	6	19.95	17.67	13.18	74.61
	O <sub>IP</sub>	0	-	-	-	-	6	8.00	9.65	2.84	29.40
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	3	7.80	11.33	6.38	56.31	6	16.45	16.00	5.11	31.93
	M <sub>IP</sub>	3	15.50	13.37	6.28	46.97	6	16.40	17.07	5.16	30.21
	O <sub>IP</sub>	2	9.00	9.00	2.55	28.28	6	14.35	18.13	11.09	61.13
100 días	C	4	7.15	9.20	5.59	60.73	5	17.30	20.18	6.70	33.17
	M <sub>IP</sub>	1	7.00	7.00	-	-	5	18.90	16.92	7.00	41.37
	M <sub>P</sub>	1	13.10	13.10	-	-	5	10.80	13.18	4.16	31.53
	O <sub>IP</sub>	1	8.40	8.40	-	-	5	15.50	21.84	14.75	67.55
	O <sub>P</sub>	3	13.90	12.17	6.28	51.63	5	12.00	18.30	14.05	76.77
246 días	C	3	10.40	11.27	5.45	48.39	19	17.30	17.71	10.14	57.25
	M <sub>IP</sub>	14	7.4	7.46	1.95	26.13	20	16.10	16.48	12.48	75.72
	M <sub>P</sub>	2	7.85	7.85	3.32	42.34	19	27.10	21.71	13.87	63.88
	O <sub>IP</sub>	4	10.95	14.08	10.51	74.68	18	15.45	21.98	16.71	76.02
	O <sub>P</sub>	5	11.9	11.54	2.11	18.31	18	9.70	13.49	12.73	94.38

**ANEXO TABLA 8. Expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	RE $\alpha$				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	0.87	0.96	0.30	30.99
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.33	0.42	0.22	51.18
	M <sub>IP</sub>	6	0.54	0.53	0.18	33.01
	O <sub>IP</sub>	6	0.38	0.43	0.17	38.31
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.31	0.35	0.19	53.08
	M <sub>IP</sub>	6	0.38	0.44	0.21	46.59
	O <sub>IP</sub>	6	0.45	0.45	0.18	39.60
100 días	C	5	0.41	0.46	0.11	23.58
	M <sub>IP</sub>	5	0.57	0.68	0.27	40.51
	M <sub>P</sub>	5	0.50	0.50	0.15	28.83
	O <sub>IP</sub>	5	0.40	0.54	0.29	54.33
	O <sub>P</sub>	5	0.63	0.66	0.25	37.50
246 días	C	15	0.75	0.71	0.35	49.33
	M <sub>IP</sub>	18	0.58	0.59	0.28	47.43
	M <sub>P</sub>	17	0.56	0.89	0.63	71.08
	O <sub>IP</sub>	16	0.60	0.80	0.53	66.08
	O <sub>P</sub>	15	0.73	0.75	0.24	31.32

**ANEXO TABLA 9. Expresión relativa del ARNm de RE $\beta$ 1 y RE $\beta$ 2 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	RE $\beta$ 1				RE $\beta$ 2			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	0.0029	0.0029	0.0013	45.57	0.008	0.0010	0.0006	63.91
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.0032	0.0029	0.0016	54.42	0.0012	0.0013	0.0008	64.94
	M <sub>IP</sub>	6	0.0021	0.0022	0.0009	40.20	0.0012	0.0011	0.0004	33.77
	O <sub>IP</sub>	6	0.0023	0.0023	0.0006	27.74	0.0010	0.0011	0.0003	32.34
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.0028	0.0028	0.0005	17.81	0.0011	0.0011	0.0002	17.40
	M <sub>IP</sub>	6	0.0028	0.0026	0.0009	33.30	0.0011	0.0012	0.0003	26.54
	O <sub>IP</sub>	6	0.0020	0.0022	0.0009	42.79	0.0009	0.0010	0.0004	38.93
100 días	C	5	0.0032	0.0033	0.0009	27.72	0.0011	0.0011	0.0003	27.91
	M <sub>IP</sub>	5	0.0015	0.0022	0.0010	43.45	0.0006	0.0009	0.0004	47.29
	M <sub>P</sub>	5	0.0016	0.0024	0.0023	99.26	0.0006	0.0008	0.0006	77.68
	O <sub>IP</sub>	5	0.0018	0.0018	0.0010	53.82	0.0009	0.0008	0.0003	36.90
	O <sub>P</sub>	5	0.0019	0.0018	0.0003	15.27	0.0006	0.0006	0.0002	36.75
246 días	C	15	0.0022	0.0028	0.0019	68.97	0.0011	0.0013	0.0008	58.57
	M <sub>IP</sub>	18	0.0026	0.0043	0.0047	108.87	0.0013	0.0024	0.0022	105.59
	M <sub>P</sub>	17	0.0024	0.0024	0.0016	67.98	0.0010	0.0012	0.0008	89.05
	O <sub>IP</sub>	16	0.0022	0.0021	0.0010	45.67	0.0009	0.0009	0.0004	75.89
	O <sub>P</sub>	15	0.0026	0.0033	0.0022	65.10	0.0014	0.0016	0.0013	85.54

**ANEXO TABLA 10. Relación entre la expresión relativa del ARNm de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	RE $\alpha$ /RE $\beta$				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	-	-	-	-
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.11	0.12	0.06	45.92
	M <sub>IP</sub>	6	0.15	0.19	0.14	71.76
	O <sub>IP</sub>	6	0.12	0.14	0.07	52.90
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.09	0.09	0.05	50.15
	M <sub>IP</sub>	6	0.10	0.14	0.09	69.68
	O <sub>IP</sub>	6	0.14	0.15	0.05	31.23
100 días	C	5	0.10	0.11	0.04	31.83
	M <sub>IP</sub>	5	0.22	0.26	0.18	68.23
	M <sub>P</sub>	5	0.26	0.26	0.17	67.22
	O <sub>IP</sub>	5	0.13	0.29	0.30	101.92
	O <sub>P</sub>	5	0.26	0.29	0.15	50.59
246 días	C	15	0.15	0.22	0.16	71.46
	M <sub>IP</sub>	18	0.11	0.14	0.11	74.11
	M <sub>P</sub>	17	0.22	0.62	1.05	169.76
	O <sub>IP</sub>	16	0.27	0.41	0.44	109.53
	O <sub>P</sub>	15	0.20	0.24	0.18	74.08

**ANEXO TABLA 11. Expresión relativa del ARNm de RP en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	RP				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	0.29	0.30	0.12	40.24
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.22	0.23	0.14	58.39
	M <sub>IP</sub>	6	0.35	0.36	0.14	43.79
	O <sub>IP</sub>	6	0.67	0.74	0.26	34.84
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.50	0.57	0.25	43.36
	M <sub>IP</sub>	6	0.59	0.61	0.27	45.02
	O <sub>IP</sub>	6	0.56	0.61	0.34	55.33
100 días	C	5	0.45	0.52	0.32	60.19
	M <sub>IP</sub>	5	0.40	0.68	0.51	74.67
	M <sub>P</sub>	5	0.25	0.85	1.09	127.14
	O <sub>IP</sub>	5	0.34	0.56	0.44	79.29
	O <sub>P</sub>	5	0.35	0.39	0.26	66.81
246 días	C	15	0.58	0.66	0.49	73.80
	M <sub>IP</sub>	18	0.50	0.59	0.32	54.72
	M <sub>P</sub>	17	0.38	0.48	0.41	84.29
	O <sub>IP</sub>	16	0.39	0.42	0.30	71.21
	O <sub>P</sub>	15	0.43	0.45	0.29	64.57

**ANEXO TABLA 12. Índice de positividad de REa en TEB, ductos y lóbulos de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. %: mediana de porcentaje de células positivas.

Edad	Grupo	REa					
		TEB		Ductos		Lóbulos	
		n	%	n	%	n	%
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	3	6.18	3	7.67	3	6.81
	M <sub>IP</sub>	4	5.88	4	7.58	2	7.57
	O <sub>IP</sub>	3	5.27	3	8.10	3	9.94
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	1	2.02	3	3.53	3	6.87
	M <sub>IP</sub>	2	2.34	3	3.04	3	4.44
	O <sub>IP</sub>	2	7.44	3	0.68	3	1.21
100 días	C	-	-	2	18.04	2	20.41
	M <sub>IP</sub>	-	-	2	4.80	2	6.39
	M <sub>P</sub>	-	-	3	4.73	3	11.76
	O <sub>IP</sub>	-	-	1	0.48	2	5.09
	O <sub>P</sub>	-	-	2	3.36	2	5.33

**ANEXO TABLA 13. Índice de positividad de REβ en TEB, ductos y lóbulos de glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. %: mediana de porcentaje de células positivas.

Edad	Grupo	REβ					
		TEB		Ductos		Lóbulos	
		n	%	n	%	n	%
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	3	0.00	1	0.00	1	0.00
	M <sub>IP</sub>	3	1.58	3	5.70	3	5.94
	O <sub>IP</sub>	3	25.22	3	28.81	3	26.21
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	2	19.98	3	0.73	3	1.32
	M <sub>IP</sub>	1	0.00	3	9.64	3	8.55
	O <sub>IP</sub>	2	17.31	3	1.57	3	0.64
100 días	C	-	-	2	0.85	2	1.29
	M <sub>IP</sub>	-	-	2	18.65	2	25.04
	M <sub>P</sub>	-	-	2	5.03	2	9.17
	O <sub>IP</sub>	-	-	2	11.36	2	7.87
	O <sub>P</sub>	-	-	2	5.06	2	4.82

**ANEXO TABLA 14. Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 36 días.**

Estr.: número de estructuras. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Grupo	Campos	Estr.	36 días				
			m	M	DS	CV	
TEB	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	28	74	2.50	2.64	2.70	102.06
	M <sub>IP</sub>	32	95	1.00	2.97	3.37	113.34
	O <sub>IP</sub>	31	97	3.00	3.13	2.88	92.16
TD	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	28	78	3.00	2.79	2.60	93.38
	M <sub>IP</sub>	32	77	2.00	2.41	2.23	92.54
	O <sub>IP</sub>	31	49	1.00	1.58	1.93	121.99
AB	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	28	21	0.00	0.75	0.97	128.94
	M <sub>IP</sub>	32	41	1.00	1.28	1.61	125.75
	O <sub>IP</sub>	31	37	0.00	1.19	1.91	159.59
Lob1	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	28	79	1.00	2.82	3.74	132.63
	M <sub>IP</sub>	32	103	2.00	3.22	3.44	106.97
	O <sub>IP</sub>	31	59	1.00	1.90	1.87	98.16
Lob2	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	28	2	0.00	0.07	0.26	367.2
	M <sub>IP</sub>	32	0	-	-	-	-
	O <sub>IP</sub>	31	2	0.00	0.07	0.25	387.08
Lob3	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	28	0	-	-	-	-
	M <sub>IP</sub>	32	0	-	-	-	-
	O <sub>IP</sub>	31	0	-	-	-	-

**ANEXO TABLA 15. Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 51 días.**  
 Estr.: número de estructuras. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Grupo		51 días					
		Campos	Estr.	m	M	DS	CV
<b>TEB</b>	<b>C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub></b>	32	13	0.00	0.41	1.01	248.99
	<b>M<sub>IP</sub></b>	31	17	0.00	0.55	1.31	239.33
	<b>O<sub>IP</sub></b>	31	14	0.00	0.45	1.03	227.54
<b>TD</b>	<b>C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub></b>	32	13	0.00	0.41	1.07	264.23
	<b>M<sub>IP</sub></b>	31	42	1.00	1.36	2.04	150.72
	<b>O<sub>IP</sub></b>	31	29	0.00	0.94	1.71	182.95
<b>AB</b>	<b>C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub></b>	32	41	1.00	1.28	1.30	101.54
	<b>M<sub>IP</sub></b>	31	48	2.00	1.55	1.39	89.55
	<b>O<sub>IP</sub></b>	31	26	0.00	0.84	1.29	154.22
<b>Lob1</b>	<b>C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub></b>	32	280	8.00	8.75	4.57	52.17
	<b>M<sub>IP</sub></b>	31	313	11.00	10.10	5.76	57.09
	<b>O<sub>IP</sub></b>	31	231	6.00	7.45	5.09	68.24
<b>Lob2</b>	<b>C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub></b>	32	28	0.00	0.88	1.45	166.12
	<b>M<sub>IP</sub></b>	31	52	1.00	1.68	2.10	125.42
	<b>O<sub>IP</sub></b>	31	89	1.00	2.87	3.86	134.52
<b>Lob3</b>	<b>C+M<sub>p</sub>+O<sub>p</sub></b>	32	0	-	-	-	-
	<b>M<sub>IP</sub></b>	31	0	-	-	-	-
	<b>O<sub>IP</sub></b>	31	0	-	-	-	-

**ANEXO TABLA 16. Número de estructuras epiteliales normales por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 100 días.**  
 Estr.: número de estructuras. n: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

100 días	TEB				TD				AB						
	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>Campos</b>	33	34	31	37	30	33	34	31	37	30	33	34	31	37	30
<b>Estr.</b>	1	3	5	2	1	151	140	144	183	172	91	115	92	139	112
<b>m</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00	4.00	3.00	3.00	3.5	2.00	3.00	2.00	3.00	3.00
<b>M</b>	0.03	0.09	0.16	0.05	0.03	4.58	4.12	4.65	4.95	5.73	2.76	3.38	2.97	3.76	3.73
<b>DS</b>	0.17	0.29	0.52	0.23	0.18	4.28	2.24	5.72	7.30	6.14	2.41	2.67	3.70	3.02	3.26
<b>CV</b>	574.46	326.29	324.02	424.10	574.72	93.53	54.39	123.24	147.58	107.12	87.44	79.07	124.72	80.45	87.27

100 días	Lob1				Lob2				Lob3						
	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
<b>Campos</b>	33	34	31	37	30	33	34	31	37	30	33	34	31	37	30
<b>Estr.</b>	278	333	262	294	212	122	123	105	108	79	0	4	2	3	1
<b>m</b>	8.00	10.00	7.00	7.00	7.00	3.00	2.00	3.00	1.00	1.50	-	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>M</b>	8.42	9.79	8.45	7.95	7.07	3.70	3.62	3.39	2.92	2.63	-	0.12	0.07	0.08	0.03
<b>DS</b>	6.21	4.82	5.37	5.20	3.48	3.14	5.22	3.14	3.30	2.08	-	0.33	0.25	0.28	0.18
<b>CV</b>	73.66	49.24	63.49	65.46	49.29	84.86	144.20	92.64	112.87	109.47	-	277.98	387.08	341.29	547.72



**ANEXO TABLA 18. Expresión relativa del ARNm de  $\beta$ -Caseína en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	$\beta$ -Caseína				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	0.01	0.02	0.03	122.93
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.72	5.87	11.89	202.53
	M <sub>IP</sub>	6	1.20	2.35	3.26	138.59
	O <sub>IP</sub>	6	0.12	1.93	4.50	233.17
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	4.31	176.28	416.43	236.23
	M <sub>IP</sub>	6	4.65	57.63	107.99	187.38
	O <sub>IP</sub>	6	8.16	26.33	44.51	169.04
100 días	C	5	3.19	5.38	5.20	96.69
	M <sub>IP</sub>	5	33.28	187.43	296.47	158.18
	M <sub>P</sub>	5	13.85	96.69	190.23	196.74
	O <sub>IP</sub>	5	12.92	185.34	397.88	214.68
	O <sub>P</sub>	5	2.18	9.39	16.57	176.46
246 días	C	15	159.47	309.40	356.88	115.35
	M <sub>IP</sub>	18	389.63	713.07	1242.09	174.19
	M <sub>P</sub>	17	205.43	724.45	1132.95	156.39
	O <sub>IP</sub>	16	128.94	287.37	429.29	149.38
	O <sub>P</sub>	15	264.97	793.36	1502.95	189.44

**ANEXO TABLA 19. Expresión relativa del ARNm de Leptina y su receptor en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	Leptina				Receptor Leptina			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	2.86	2.88	1.20	41.47	0.0017	0.0018	0.0006	33.58
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	1.20	1.27	0.42	33.56	0.0027	0.0028	0.0007	24.79
	M <sub>IP</sub>	6	2.30	2.10	0.90	42.94	0.0028	0.0027	0.0005	17.76
	O <sub>IP</sub>	6	1.22	1.40	0.62	43.99	0.0031	0.0032	0.0011	36.31
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.82	0.77	0.37	47.80	0.0035	0.0037	0.0007	19.07
	M <sub>IP</sub>	6	0.98	1.26	0.79	62.73	0.0050	0.0049	0.0008	16.50
	O <sub>IP</sub>	6	0.66	0.97	0.67	69.30	0.0035	0.0036	0.0009	25.83
100 días	C	5	1.99	1.80	0.84	46.86	0.0032	0.0034	0.0007	50.89
	M <sub>IP</sub>	5	2.54	2.65	1.24	46.69	0.0040	0.0036	0.0008	23.50
	M <sub>P</sub>	5	1.85	2.75	1.74	63.18	0.0041	0.0040	0.0009	22.64
	O <sub>IP</sub>	5	2.89	3.71	2.86	77.24	0.0042	0.0047	0.0013	27.32
	O <sub>P</sub>	5	1.61	1.98	1.27	64.18	0.0044	0.0045	0.0010	22.09
246 días	C	10	2.25	2.89	1.83	63.53	0.0039	0.0041	0.0022	52.15
	M <sub>IP</sub>	10	4.23	4.50	2.88	64.04	0.0030	0.0032	0.0007	21.50
	M <sub>P</sub>	10	3.09	5.13	5.14	100.17	0.0046	0.0043	0.0017	39.58
	O <sub>IP</sub>	10	3.39	4.15	2.85	68.70	0.0052	0.0048	0.0021	43.47
	O <sub>P</sub>	10	2.34	3.56	5.04	141.54	0.0033	0.0034	0.0013	37.15

**ANEXO TABLA 20. Expresión relativa del ARNm de Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	Adiponectina				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	104.67	108.28	25.47	23.53
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	73.51	77.83	34.16	43.88
	M <sub>IP</sub>	6	75.75	70.81	20.71	29.25
	O <sub>IP</sub>	6	64.98	62.78	9.59	15.27
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	43.03	42.35	13.86	32.73
	M <sub>IP</sub>	6	34.20	41.19	17.50	42.47
	O <sub>IP</sub>	6	30.78	35.20	10.22	29.03
100 días	C	5	56.02	60.01	12.35	20.58
	M <sub>IP</sub>	5	49.51	52.72	19.74	37.44
	M <sub>P</sub>	5	51.02	51.02	8.49	16.65
	O <sub>IP</sub>	5	46.03	51.39	24.01	46.73
	O <sub>P</sub>	5	48.61	45.83	13.20	28.81
246 días	C	17	62.65	66.62	22.61	33.93
	M <sub>IP</sub>	18	40.53	42.93	14.92	34.75
	M <sub>P</sub>	18	50.90	49.94	26.98	54.02
	O <sub>IP</sub>	18	45.76	47.26	21.79	46.11
	O <sub>P</sub>	18	36.11	43.26	21.77	50.33

**ANEXO TABLA 21. Relación entre la expresión relativa del ARNm de Leptina y Adiponectina en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	Ratio Lep/AdipoQ				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	0.0260	0.0264	0.0096	36.53
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.0175	0.0178	0.0056	31.66
	M <sub>IP</sub>	6	0.0317	0.0287	0.0076	26.53
	O <sub>IP</sub>	6	0.0200	0.0237	0.0137	57.68
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.0171	0.0180	0.0068	37.77
	M <sub>IP</sub>	6	0.0291	0.0322	0.0178	55.30
	O <sub>IP</sub>	6	0.0216	0.0257	0.0109	42.36
100 días	C	5	0.0295	0.0307	0.0153	49.91
	M <sub>IP</sub>	5	0.0461	0.0488	0.0137	28.11
	M <sub>P</sub>	5	0.0438	0.0523	0.0253	48.39
	O <sub>IP</sub>	5	0.0628	0.0651	0.0206	31.68
	O <sub>P</sub>	5	0.0351	0.0408	0.0146	35.65
246 días	C	10	0.0423	0.0445	0.0208	46.76
	M <sub>IP</sub>	10	0.0837	0.0993	0.0465	46.83
	M <sub>P</sub>	9	0.0704	0.1057	0.0687	65.01
	O <sub>IP</sub>	10	0.0864	0.0944	0.0357	37.87
	O <sub>P</sub>	10	0.0581	0.0811	0.0432	53.33

**ANEXO TABLA 22. Expresión relativa del ARNm de PPAR $\gamma$  en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	PPAR $\gamma$				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	3.05	3.04	1.03	33.75
	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	1.64	1.55	0.69	44.70
36 días	M <sub>IP</sub>	6	1.00	1.02	0.95	92.95
	O <sub>IP</sub>	6	0.98	0.99	0.15	15.09
	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.98	0.98	0.54	55.51
51 días	M <sub>IP</sub>	6	0.63	0.61	0.21	34.71
	O <sub>IP</sub>	6	0.45	0.46	0.06	12.95
	C	5	1.01	1.03	0.29	28.03
100 días	M <sub>IP</sub>	5	1.18	1.12	0.41	36.56
	M <sub>P</sub>	5	1.05	1.04	0.29	27.85
	O <sub>IP</sub>	5	0.77	1.01	0.55	54.23
	O <sub>P</sub>	5	0.96	1.14	0.68	59.88
	C	17	0.88	0.88	0.29	33.36
246 días	M <sub>IP</sub>	18	0.60	0.58	0.17	29.81
	M <sub>P</sub>	18	0.69	0.72	0.35	48.97
	O <sub>IP</sub>	18	0.72	0.83	0.40	48.34
	O <sub>P</sub>	18	0.49	0.58	0.31	52.55
	C	17	0.88	0.88	0.29	33.36

**ANEXO TABLA 23. Número de estructuras proliferativas anómalas por campo de gran aumento (400X) de los grupos experimentales a 246 días.** Estr.: número de estructuras. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

H	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	PIDL1	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
Campos	80	85	85	81	98	Campos	80	85	85	81	98
Estr.	130	197	203	23	113	Estr.	112	263	254	129	295
m	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	m	0.00	1.00	1.00	0.00	2.00
M	1.63	2.32	2.39	0.28	1.15	M	1.40	3.09	2.99	1.59	3.01
DS	4.98	3.65	5.53	0.84	2.36	DS	2.66	4.12	4.34	2.43	3.98
CV	306.74	157.44	231.34	295.88	204.38	CV	190.38	133.13	145.09	152.77	132.07

PIDL2	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>	T	C	M <sub>IP</sub>	M <sub>P</sub>	O <sub>IP</sub>	O <sub>P</sub>
Campos	80	85	85	81	98	Campos	80	85	85	81	98
Estr.	40	98	95	85	150	Estr.	5	15	19	17	31
m	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	m	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M	0.50	1.15	1.12	1.05	1.53	M	0.06	0.18	0.22	0.21	0.32
DS	1.71	2.22	1.99	2.09	2.59	DS	0.33	0.41	0.56	0.67	0.98
CV	342.74	192.79	177.56	199.27	169.44	CV	530.58	234.24	252.47	317.10	309.87

**ANEXO TABLA 24. Expresión relativa del ARNm de CuZnSOD, MnSOD y SOD total (CuZnSOD+MnSOD) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).**

Edad	Grupo	n	CuZnSOD				MnSOD				CuZnSOD+MnSOD			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	1.95	1.96	0.32	16.41	1.74	1.74	0.19	11.01	3.78	3.70	0.33	8.93
	C+Mp+Op	6	2.41	2.48	0.95	38.31	1.97	2.03	0.67	32.75	4.38	4.52	1.42	31.36
	M <sub>ip</sub>	6	1.72	1.86	0.63	33.54	1.86	1.88	0.15	7.84	3.70	3.75	0.71	19.00
36 días	Op	6	1.13	1.19	0.25	20.83	1.76	1.78	0.12	6.96	2.92	2.97	0.25	8.31
	C+Mp+Op	6	1.43	1.60	0.56	35.15	2.07	2.09	0.16	7.75	3.63	3.70	0.59	15.98
	M <sub>ip</sub>	6	1.20	1.21	0.08	6.80	1.87	1.94	0.34	17.35	3.06	3.15	0.34	10.82
51 días	Op	6	1.26	1.32	0.31	23.18	2.13	2.05	0.40	19.68	3.42	3.37	0.60	17.69
	C	5	4.43	4.58	0.68	14.86	2.33	2.28	0.09	3.85	6.59	6.85	0.64	9.40
	M <sub>ip</sub>	5	3.91	3.98	0.43	10.80	2.81	2.74	0.74	26.93	6.73	6.72	0.75	11.14
100 días	M <sub>p</sub>	5	3.77	4.10	1.00	24.44	2.21	2.20	0.27	12.30	5.90	6.29	1.10	17.51
	Op	5	2.49	2.24	0.72	32.14	1.87	1.87	0.15	7.90	4.50	4.11	0.72	17.58
	Op	5	1.52	1.59	0.38	23.79	1.79	1.80	0.11	5.86	3.34	3.38	0.42	12.53
246 días	C	15	2.78	3.07	1.05	34.31	4.68	4.55	1.22	26.88	7.26	7.62	2.13	27.98
	M <sub>ip</sub>	15	3.40	3.44	1.30	37.88	5.15	5.26	1.59	30.32	8.90	8.70	2.40	27.61
	M <sub>p</sub>	15	3.22	3.47	1.39	40.00	5.04	5.43	2.26	41.69	8.66	8.90	3.42	38.43
	Op	15	2.92	3.14	1.50	47.71	4.60	4.84	1.21	25.04	7.73	7.98	2.02	25.36
	Op	15	2.96	2.96	1.09	36.72	3.78	4.64	1.90	40.98	7.85	7.60	2.34	30.76

**ANEXO TABLA 25. Expresión relativa del ARNm de cGPx, PHGPx y GPx total (cGPx+PHGPx) en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).**

Edad	Grupo	n	cGPx				PHGPx				cGPx+PHGPx			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	3.63	3.62	0.33	9.21	1.63	1.60	0.16	9.81	5.24	5.22	0.40	7.62
	C+M <sub>IP</sub> +O <sub>IP</sub>	6	2.93	2.90	0.65	22.23	1.46	1.59	0.34	21.13	4.72	4.49	0.68	15.03
	M <sub>IP</sub>	6	2.60	2.66	0.36	13.51	1.44	1.40	0.22	15.30	4.20	4.07	0.50	12.29
36 días	O <sub>IP</sub>	6	2.77	2.98	0.63	21.19	1.20	1.20	0.12	9.69	4.01	4.18	0.63	15.06
	C+M <sub>IP</sub> +O <sub>IP</sub>	6	3.27	2.97	0.92	30.97	1.22	1.33	0.37	28.13	4.42	4.30	1.14	26.53
	M <sub>IP</sub>	6	4.03	4.09	0.45	11.11	1.19	1.22	0.14	11.47	5.21	5.31	0.59	11.13
51 días	O <sub>IP</sub>	6	3.81	4.15	0.96	23.19	1.08	1.13	0.15	13.42	4.84	5.27	1.03	19.53
	C	5	4.44	4.48	0.34	7.68	1.88	1.87	0.17	9.15	6.20	6.35	0.45	7.01
	M <sub>IP</sub>	5	4.52	4.24	0.55	12.96	1.58	1.72	0.22	12.78	6.26	5.96	0.68	11.46
100 días	M <sub>P</sub>	5	4.55	4.88	1.32	27.12	1.53	1.54	0.14	8.77	5.99	6.42	1.41	21.91
	O <sub>IP</sub>	5	4.50	4.83	0.83	17.22	1.58	1.52	0.17	11.30	6.58	6.35	0.73	11.57
	O <sub>P</sub>	5	6.06	6.03	1.37	22.72	1.52	1.41	0.17	12.01	7.25	7.44	1.27	17.10
246 días	C	17	5.70	6.01	1.99	33.16	2.63	2.68	0.54	20.22	8.19	8.69	1.76	20.31
	M <sub>IP</sub>	18	5.57	6.05	1.89	31.22	2.43	2.38	0.28	11.77	7.89	8.44	2.01	23.88
	M <sub>P</sub>	18	5.38	5.97	2.39	40.11	2.40	2.45	0.51	20.88	8.10	8.41	2.28	27.06
	O <sub>IP</sub>	18	6.62	7.61	6.15	80.84	2.22	2.30	0.49	21.40	9.31	9.90	6.25	63.07
	O <sub>P</sub>	18	5.28	6.00	3.25	54.23	2.21	2.16	0.58	26.99	7.22	8.15	3.22	39.54

**ANEXO TABLA 26. Expresión relativa del ARNm de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	CAT				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	16.96	16.74	2.74	16.40
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	15.15	15.08	4.66	30.92
	M <sub>IP</sub>	6	12.96	11.44	3.06	26.77
	O <sub>IP</sub>	6	11.55	11.50	1.14	9.91
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	15.60	14.36	4.78	33.26
	M <sub>IP</sub>	6	10.46	10.06	1.95	19.35
	O <sub>IP</sub>	6	10.98	11.58	1.83	15.80
100 días	C	5	12.40	12.77	1.04	8.14
	M <sub>IP</sub>	5	12.85	12.65	2.34	18.48
	M <sub>P</sub>	5	10.68	12.38	4.73	38.23
	O <sub>IP</sub>	5	12.40	13.03	3.10	23.81
	O <sub>P</sub>	5	12.77	12.77	2.65	20.72
246 días	C	17	26.64	29.89	12.04	40.26
	M <sub>IP</sub>	18	21.77	23.88	8.91	37.33
	M <sub>P</sub>	18	28.20	27.97	9.76	34.91
	O <sub>IP</sub>	18	23.87	25.61	10.63	41.51
	O <sub>P</sub>	18	23.71	27.36	15.89	58.05

**ANEXO TABLA 27. Niveles de actividad de CuZnSOD y SOD total en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	CuZnSOD				SOD total			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	12.20	11.71	2.59	22.08	10.22	10.94	1.98	18.13
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	36.68	32.84	9.97	30.35	30.77	30.82	6.47	20.98
	M <sub>IP</sub>	6	25.08	23.54	4.58	19.47	23.18	23.21	4.94	21.30
	O <sub>IP</sub>	6	17.40	16.83	6.34	37.69	20.91	22.22	8.48	38.15
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	18.22	19.99	7.83	39.15	23.52	23.11	5.84	25.25
	M <sub>IP</sub>	6	18.59	20.07	4.37	21.75	20.47	20.09	4.78	23.79
	O <sub>IP</sub>	6	18.87	20.34	5.93	29.14	19.08	21.29	5.19	24.38
100 días	C	5	11.95	14.06	4.62	32.86	17.08	16.58	3.86	23.29
	M <sub>IP</sub>	5	14.46	14.61	1.01	7.30	10.63	12.94	4.97	38.39
	M <sub>P</sub>	5	13.28	13.86	1.73	12.51	13.24	15.02	4.45	29.65
	O <sub>IP</sub>	5	9.07	9.35	3.04	32.55	12.12	10.95	2.70	24.66
	O <sub>P</sub>	5	14.58	14.05	5.33	37.96	10.66	11.78	6.08	51.60
246 días	C	15	16.31	16.54	2.00	12.08	15.27	15.55	1.93	12.39
	M <sub>IP</sub>	17	17.36	17.36	3.34	19.22	15.04	15.66	3.69	23.59
	M <sub>P</sub>	17	18.70	18.86	4.77	25.30	17.46	18.28	4.97	27.17
	O <sub>IP</sub>	15	17.53	16.98	4.12	24.25	16.63	16.22	3.40	20.99
	O <sub>P</sub>	15	18.19	19.62	5.21	26.57	18.53	19.12	4.27	22.36

**ANEXO TABLA 28. Niveles de actividad de GPx en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.**

n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	GPx				
		n	m	M	DS	CV
24 días		4	68.94	71.18	4.64	6.52
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	61.51	58.83	18.06	30.69
	M <sub>IP</sub>	5	63.70	63.04	9.82	15.58
	O <sub>IP</sub>	4	56.37	55.56	3.31	5.96
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	52.66	57.01	21.31	37.38
	M <sub>IP</sub>	5	89.08	84.71	7.10	8.38
	O <sub>IP</sub>	5	56.21	58.25	15.01	25.77
100 días	C	3	54.50	62.42	14.17	22.70
	M <sub>IP</sub>	5	56.02	59.51	21.72	36.50
	M <sub>P</sub>	5	70.84	79.65	21.71	27.25
	O <sub>IP</sub>	5	63.57	74.41	48.86	65.66
	O <sub>P</sub>	5	68.97	78.53	19.06	24.26
246 días	C	15	76.12	73.91	10.12	13.70
	M <sub>IP</sub>	17	71.53	78.02	21.63	27.73
	M <sub>P</sub>	17	70.87	68.66	15.63	22.76
	O <sub>IP</sub>	15	71.33	66.79	14.00	20.97
	O <sub>P</sub>	14	63.57	69.05	12.33	17.86

**ANEXO TABLA 29. Niveles de actividad de Catalasa en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	CAT				
		n	m	M	DS	CV
24 días		3	129.29	121.99	17.46	14.31
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	5	111.00	120.71	38.46	31.86
	M <sub>IP</sub>	5	45.92	59.70	36.77	61.60
	O <sub>IP</sub>	3	47.18	36.92	21.76	58.93
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	5	93.92	111.05	40.28	36.28
	M <sub>IP</sub>	5	43.85	44.89	35.25	78.52
	O <sub>IP</sub>	5	29.93	22.56	16.04	71.10
100 días	C	5	57.67	53.69	21.99	40.95
	M <sub>IP</sub>	3	43.52	47.70	35.21	73.81
	M <sub>P</sub>	5	49.50	63.24	55.13	87.18
	O <sub>IP</sub>	4	18.85	37.06	51.03	137.69
	O <sub>P</sub>	5	28.87	22.98	16.85	73.34
246 días	C	15	94.99	98.24	32.15	32.72
	M <sub>IP</sub>	17	87.78	97.01	37.08	38.23
	M <sub>P</sub>	17	74.54	85.15	34.36	40.36
	O <sub>IP</sub>	15	84.84	90.98	30.34	33.34
	O <sub>P</sub>	14	74.65	83.94	32.67	38.92

**ANEXO TABLA 30. Niveles de GSSG, GSH y la relación GSSG/GSH en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	GSSG				GSH				GSSG/GSH			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
36 días	C+M <sub>p</sub> +O <sub>p</sub>	6	12.71	13.13	4.50	34.29	77.66	75.31	29.51	39.18	18.40	18.90	7.00	37.04
	M <sub>p</sub>	6	29.86	68.79	95.67	139.09	130.31	179.90	187.88	104.44	33.41	35.04	12.94	36.93
	O <sub>p</sub>	4	88.96	87.27	81.98	93.94	277.03	268.95	213.34	79.32	31.71	29.68	10.56	35.59
51 días	C+M <sub>p</sub> +O <sub>p</sub>	6	41.29	60.51	57.66	95.29	179.84	204.38	181.54	88.83	30.40	40.54	23.98	59.16
	M <sub>p</sub>	5	37.00	89.50	100.70	112.52	170.00	259.75	237.14	91.30	31.29	31.36	12.08	38.51
	O <sub>p</sub>	5	94.50	121.21	95.12	78.48	263.44	335.31	207.06	61.75	31.69	32.31	11.64	36.03
100 días	C	5	67.71	87.86	76.50	87.07	307.19	269.06	162.08	60.24	22.04	27.92	11.42	40.92
	M <sub>p</sub>	5	26.29	44.71	46.73	104.52	126.88	172.31	149.94	87.02	23.85	23.87	3.96	16.58
	M <sub>p</sub>	5	140.93	102.14	65.77	64.39	333.13	346.06	167.54	48.41	27.74	27.16	11.20	41.24
	O <sub>p</sub>	5	7.00	20.29	21.63	106.62	26.56	122.19	146.07	119.55	24.83	21.77	5.61	25.78
	O <sub>p</sub>	5	21.64	97.50	111.61	114.47	114.69	239.63	216.42	90.32	32.56	31.80	14.58	45.83
246 días	C	18	52.36	75.85	80.51	106.14	142.19	202.85	175.35	86.44	23.29	49.28	97.89	198.66
	M <sub>p</sub>	18	75.93	127.43	136.18	106.87	273.44	278.96	208.00	74.56	39.89	46.12	38.48	83.43
	M <sub>p</sub>	18	73.43	113.73	119.40	104.99	285.47	274.29	164.96	60.14	28.64	34.92	22.03	63.09
	O <sub>p</sub>	18	8.07	26.54	46.74	176.10	51.25	88.21	118.53	134.37	25.90	24.88	9.49	38.15
O <sub>p</sub>	18	126.11	150.83	117.70	78.03	414.53	354.39	187.82	53.00	34.71	38.32	13.41	35.01	

**ANEXO TABLA 31. Expresión relativa del ARNm de GSR en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	GSR				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	1.17	1.17	0.10	8.54
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.92	0.88	0.23	26.23
	M <sub>IP</sub>	6	0.75	0.74	0.20	26.83
	O <sub>IP</sub>	6	0.79	0.76	0.12	15.27
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	0.74	0.76	0.19	24.83
	M <sub>IP</sub>	6	0.69	0.67	0.10	15.32
	O <sub>IP</sub>	6	0.72	0.72	0.09	12.57
100 días	C	5	0.93	0.88	0.16	17.88
	M <sub>IP</sub>	5	0.95	0.96	0.13	13.40
	M <sub>P</sub>	5	0.89	0.97	0.34	35.04
	O <sub>IP</sub>	5	0.73	0.85	0.23	27.75
	O <sub>P</sub>	5	0.76	0.77	0.14	18.01
246 días	C	17	1.06	1.02	0.27	26.35
	M <sub>IP</sub>	18	1.01	0.97	0.24	25.20
	M <sub>P</sub>	18	1.04	1.02	0.29	28.11
	O <sub>IP</sub>	18	0.90	0.92	0.22	23.91
	O <sub>P</sub>	18	0.91	0.92	0.31	33.48

**ANEXO TABLA 32. Niveles de F<sub>2</sub>-IsoP libres en plasma de animales de los grupos experimentales a diferentes edades.**

n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	F <sub>2</sub> -IsoP				
		n	m	M	DS	CV
24 días		4	1929.60	5119.40	7142.01	139.51
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	2097.20	5475.03	7259.66	132.60
	M <sub>IP</sub>	6	6235.20	6562.80	5282.23	80.49
	O <sub>IP</sub>	6	3921.10	7069.53	7052.43	99.76
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	1133.10	1336.80	862.49	64.52
	M <sub>IP</sub>	6	1967.80	2149.90	1515.42	70.49
	O <sub>IP</sub>	6	852.60	1521.93	1838.76	120.82
100 días	C	5	926.20	1658.40	2093.38	126.23
	M <sub>IP</sub>	5	5905.20	4777.80	3500.93	73.28
	M <sub>P</sub>	5	2294.40	5866.16	6777.75	115.54
	O <sub>IP</sub>	5	6223.60	7265.16	4091.23	56.31
	O <sub>P</sub>	5	2065.60	4760.64	4705.30	98.84
246 días	C	19	4319.20	6410.83	6000.20	93.59
	M <sub>IP</sub>	20	1844.00	3954.65	4805.37	121.51
	M <sub>P</sub>	19	1057.40	3269.66	4829.54	147.71
	O <sub>IP</sub>	18	997.00	3517.53	4669.25	132.74
	O <sub>P</sub>	18	2343.70	4243.12	5561.76	131.08

**ANEXO TABLA 33. Niveles de 8-oxo-dG en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	8-oxo-dG				
		n	m	M	DS	CV
24 días		6	14.28	14.15	1.01	7.16
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	16.67	16.98	3.83	22.57
	M <sub>IP</sub>	6	11.76	12.07	1.53	12.67
	O <sub>IP</sub>	6	11.27	12.09	2.68	22.20
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	12.98	15.01	6.16	41.05
	M <sub>IP</sub>	6	10.94	10.94	1.30	11.98
	O <sub>IP</sub>	6	11.40	12.41	2.25	18.12
100 días	C	5	10.35	10.73	0.93	8.62
	M <sub>IP</sub>	5	12.27	11.78	1.04	8.85
	M <sub>P</sub>	5	24.10	22.08	4.31	19.53
	O <sub>IP</sub>	5	16.18	16.77	4.84	28.88
	O <sub>P</sub>	5	18.91	17.90	3.73	20.84
246 días	C	18	11.55	11.78	1.92	16.30
	M <sub>IP</sub>	18	10.95	12.29	3.69	30.00
	M <sub>P</sub>	18	10.94	11.59	2.68	23.15
	O <sub>IP</sub>	18	13.48	13.68	2.46	17.97
	O <sub>P</sub>	18	13.86	14.25	3.93	27.59

**ANEXO TABLA 34. Ensayo Comet en glándula mamaria y muestras de sangre de los animales de los grupos experimentales a diferentes edades.** n: número de efectivos. m: mediana. M: media. DS: desviación estándar. CV: coeficiente de variación (%).

Edad	Grupo	n	CuZnSOD				SOD total			
			m	M	DS	CV	m	M	DS	CV
24 días		6	57.23	55.03	18.63	33.85	40.25	39.87	5.97	14.96
36 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	91.65	91.43	3.90	4.26	29.71	30.23	2.78	9.19
	M <sub>IP</sub>	6	89.76	81.31	22.17	27.26	28.24	28.35	1.14	4.04
	O <sub>IP</sub>	6	89.78	87.21	11.16	12.80	33.96	33.97	2.16	6.54
51 días	C+M <sub>P</sub> +O <sub>P</sub>	6	73.82	73.75	11.77	15.97	39.16	36.80	7.20	19.56
	M <sub>IP</sub>	6	65.01	68.31	14.18	20.76	36.14	36.07	3.09	8.56
	O <sub>IP</sub>	6	62.76	67.90	14.34	21.12	36.38	37.40	4.00	10.69
100 días	C	5	68.36	71.99	12.31	17.11	29.44	28.74	1.54	5.34
	M <sub>IP</sub>	5	75.98	68.44	22.75	33.24	29.13	30.26	4.10	13.57
	M <sub>P</sub>	5	77.89	64.37	23.64	36.73	28.66	28.63	2.34	8.17
	O <sub>IP</sub>	5	79.94	74.71	13.14	17.59	31.61	33.24	4.50	13.54
	O <sub>P</sub>	5	79.29	68.02	22.20	32.64	39.38	40.09	6.62	16.51
246 días	C	18	55.48	55.05	14.80	26.88	29.18	30.04	7.04	23.44
	M <sub>IP</sub>	19	49.65	51.70	14.53	28.12	35.68	35.59	7.98	22.42
	M <sub>P</sub>	17	48.67	47.92	15.98	33.35	32.64	33.97	10.48	30.86
	O <sub>IP</sub>	19	41.24	44.65	15.30	34.26	32.51	34.44	9.86	28.63
	O <sub>P</sub>	19	50.93	54.65	14.91	27.28	33.21	35.05	7.08	20.19

ANEXO TABLA 35. Genes diferencialmente expresados por efecto de los lípidos de la dieta, en glándula mamaria, implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés.

36 días M <sub>IP</sub> Genes Infraexpresados	Símbolo	Nombre	Ref.GenBank
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0000226, GO:0008219, GO:0012501, GO:0043085, GO:0007584	Bud31	BUD31 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	NM_053556
	Cd28	Cd28 molecule	NM_013121
	Cd38	CD38 molecule	NM_013127
	cd5	Cd5 molecule	NM_019295
	Dgka	diacylglycerol kinase, alpha	NM_080787
	Dgkz	diacylglycerol kinase zeta	NM_031143
	Diablo	diablo, IAP-binding mitochondrial protein	NM_001008292
	Dnase113	deoxyribonuclease 1-like 3	NM_053907
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	NM_001008321
	Id3	inhibitor of DNA binding 3	NM_013058
	Lyz2	lysozyme 2	NM_012771
	Npm1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NM_012992
	Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	NM_017318
	Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	NM_017317
	Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578	
Tp53inp1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	NM_181084	
Tuba1b	tubulin, alpha 1B	NM_001044270	
<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006950, GO:0006979, GO:0019725, GO:0051707, GO:0016337, GO:0050776, GO:0002526, GO:0050826, GO:0006793, GO:0007626, GO:0031589, GO:0060548, GO:0001819, GO:0019953, GO:0048609, GO:0009914, GO:0045471, GO:0045927	Adrbk1	adrenergic, beta, receptor kinase 1	NM_012776
	Arbp	ribosomal protein, large, P0	NM_022402
	Atp5i	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	NM_080481
	Atp5o	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	NM_138883
	Bud31	BUD31 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	NM_053556
	Cd19	CD19 molecule	NM_001013237
	Cd28	Cd28 molecule	NM_013121
	Cd37	CD37 molecule	NM_017124
	Cd38	CD38 molecule	NM_013127
	Cd79b	Cd79b molecule, immunoglobulin-associated beta	NM_133533
	cd8a	CD8a molecule	NM_031538
	Coro1a	coronin, actin binding protein 1A	NM_130411
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Dgka	diacylglycerol kinase, alpha	NM_080787
	Dgkz	diacylglycerol kinase zeta	NM_031143
	Dusp2	dual specificity phosphatase 2	NM_001012089
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	NM_001008321
	Grk6	G protein-coupled receptor kinase 6	NM_001112712
	hla-dma	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	NM_198741
	Id3	inhibitor of DNA binding 3	NM_013058
	Lyn	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	NM_001111098
	Lyz2	lysozyme 2	NM_012771
	Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1	NM_173096
	Ninj1	ninjurin 1	NM_012867
	Nme2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B)	NM_031833
	Npm1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NM_012992
	Pkn1	protein kinase N1	NM_017175
	Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
Prkcb	protein kinase C, beta	NM_001172305	
Prkch	protein kinase C, eta	NM_031085	
Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	NM_017318	
Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	NM_053908	

Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	NM_017317
Rac2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	NM_001008384
Rbm4	RNA binding motif protein 4	NM_001170484
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	NM_001008831
Selplg	selectin P ligand	NM_001013230
Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
Stk38	serine/threonine kinase 38	NM_001015025
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578
Tp53inp1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	NM_181084
Ucp2	uncoupling protein 2	NM_019354

Arbp	ribosomal protein, large, P0	NM_022402
Bud31	BUD31 homolog (S. cerevisiae)	NM_053556
Cd28	Cd28 molecule	NM_013121
Cd38	CD38 molecule	NM_013127
Cdc42se1	CDC42 small effector 1	NM_001039044
Coro1a	coronin, actin binding protein 1A	NM_130411
Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
hla-dma	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	NM_198741
Id3	inhibitor of DNA binding 3	NM_013058
Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma	NM_080889
LOC364236	similar to 40S ribosomal protein S19	
Lyn	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	NM_001111098
MGC72973	hemoglobin, beta adult major chain	NM_198776
Nme2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	NM_031833
Npm1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NM_012992
Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
Prkcb	protein kinase C, beta	NM_001172305
Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	NM_017318
Rac2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	NM_001008384
Rbm4	RNA binding motif protein 4	NM_001170484
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	NM_001008831
Satb1	SATB homeobox 1	NM_001012129
Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578

**Metabolismo**

GO:0042592, GO:0051259,  
GO:0022008, GO:0009892,  
GO:0050793

**36 días**

**O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006954	C6	complement component 6	NM_176074
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Tf	transferrin	NM_001013110

<b>Metabolismo</b> GO:0006082, GO:0006629, GO:0008610, GO:0005975, GO:0006066	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_023104
	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acadsb	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	NM_013084
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Lalba	lactalbumin, alpha	NM_012594
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
	pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	NM_001004072
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	NM_057135	

Pfk1	phosphofructokinase, liver	NM_013190
Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
Slc27a1	solute carrier family 27, member 1	NM_053580
Taldo1	transaldolase 1	NM_031811
Tkt	transketolase	NM_022592

**36 días****O<sub>IP</sub> Genes Sobrexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0044262, GO:0006259	Banf1	barrier to autointegration factor 1	NM_053631
	Eno3	enolase 3, beta, muscle	NM_012949
	Hmgn1	high-mobility group nucleosome binding domain 1	NM_001013184
	Oxtr	oxytocin receptor	NM_012871
	Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	NM_198780
	Pcna	proliferating cell nuclear antigen	NM_022381
	Pfkm	phosphofructokinase, muscle	NM_031715

**51 días****M<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501, GO:0043067	Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	NM_144744
	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	Cat	catalase	NM_012520
	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	NM_012524
	Cstb	cystatin B (stefin B)	NM_012838
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	NM_031353

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006954, GO:0001816, GO:0002520, GO:0001817	Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	NM_144744
	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	NM_012524
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_053365
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	LOC364236	similar to 40S ribosomal protein S19	
	Mif	macrophage migration inhibitory factor	NM_031051
Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050	

<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006629, GO:0005975, GO:0006066, GO:0006766, GO:0009890, GO:0009892, GO:0008643, GO:0019216, GO:0006109	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_023104
	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820
	Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	NM_144744
	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	NM_138547
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Aqp7	aquaporin 7	NM_019157
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Cat	catalase	NM_012520
	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein alpha	NM_012524
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_053437
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Echs1	enoyl CoA hydratase short chain 1	NM_078623
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_053365
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006

Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	NM_022215
Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
Lpin1	lipin 1	NM_001012111
Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	NM_031049
Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	NM_033235
Mif	macrophage migration inhibitory factor	NM_031051
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	NM_057135
Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
Rasd1	RAS, dexamethasone-induced 1	AF239157
Retsat	retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)	NM_145084
Sc5dl	sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, <i>S. cerevisiae</i> )-like	NM_053642
Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	NM_053580
Slc2a4	solute carrier family 2 member 4	NM_012751
Smpdl3a	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	NM_001005539
Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
Taldo1	transaldolase 1	NM_031811
Tkt	transketolase	NM_022592

**51 días**

**O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0008219, GO:0012501, GO:0043067	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	C6	complement component 6	NM_176074
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	NM_022264
	Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	NM_013174
	Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006954, GO:0001816	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	C6	complement component 6	NM_176074
	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_053365
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
	Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050

<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006629, GO:0008610, GO:0005975, GO:0006066, GO:0016042, GO:0019216	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_023104
	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acadsb	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	NM_013084
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Acs1l	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820
	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	NM_138547
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Chi3l1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	NM_053560
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_053365
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	NM_022215
	Hk2	hexokinase 2	NM_012735

Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	NM_017080
Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
Kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	NM_022264
Lalba	lactalbumin, alpha	NM_012594
Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
Lpin1	lipin 1	NM_001012111
Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	NM_031049
Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD	NM_033235
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	NM_001004072
Pdha2	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	NM_053580
Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
Taldo1	transaldolase 1	NM_031811
Tkt	transketolase	NM_022592

**100 días****M<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0006629	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_023104
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841

**100 días****M<sub>P</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501	Alb	albumin	NM_134326
	ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	NM_080906
	Npm1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NM_012992

<b>Metabolismo</b> GO:0006082, GO:0006629, GO:0019752	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_012600
	Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841

**100 días****O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0019752	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274

**100 días****O<sub>P</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006519, GO:0008610, GO:0005975, GO:0006066	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_023104
	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820
	Asns	asparagine synthetase	NM_013079
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Lalba	lactalbumin, alpha	NM_012594

Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1	NM_134349
Mif	macrophage migration inhibitory factor	NM_031051
Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
Psat1	phosphoserine aminotransferase 1	NM_198738

**246 días****M<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006954, GO:0002526	C6	complement component 6	NM_176074
	Cfb	complement factor B	NM_212466
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
	RT1-CE16	RT1 class I, locus CE16	NM_001008839

<b>Metabolismo</b> GO:0005975, GO:0006066, GO:0006629, GO:0008610, GO:0006082, GO:0016051, GO:0006766	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_023104
	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acacb	acetyl-CoA carboxylase beta	NM_053922
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Acy1	aminoacylase 1	NM_001005383
	Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	NM_031057
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Asns	asparagine synthetase	NM_013079
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Cdo1	cysteine dioxygenase, type I	NM_052809
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_053437
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Echs1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	NM_078623
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	NM_017181
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Ivd	isovaleryl-CoA dehydrogenase	NM_012592
	Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
	Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	NM_033235
	Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_012600
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268	
Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	NM_053580	
Taldo1	transaldolase 1	NM_031811	
Tkt	transketolase	NM_022592	

**246 días****M<sub>P</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501, GO:0043067	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	C6	complement component 6	NM_176074
	Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	NM_131902
	Cidec	cell death-inducing DFFA-like effector c	NM_001024333
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Ghr	growth hormone receptor	NM_017094
	Hspb1	heat shock protein 1	NM_031970
	Ldha	lactate dehydrogenase A	NM_017025
	Ptma	prothymosin alpha	NM_021740
	Serpib9	serpin peptidase inhibitor, clade B member 9	NM_001007732
	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	NM_013174
	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	NM_031353

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006952, GO:0006954, GO:0002526	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	C6	complement component 6	NM_176074
	Cfb	complement factor B	NM_212466
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Fgg	fibrinogen gamma chain	NM_012559
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
	Ptges	prostaglandin E synthase	NM_021583
<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0019216, GO:0008610, GO:0019752, GO:0006066, GO:0016042	Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820
	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	NM_031057
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Asrg11	asparaginase like 1	NM_145089
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Cdo1	cysteine dioxygenase, type I	NM_052809
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_053437
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Echs1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1	NM_078623
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Ghr	growth hormone receptor	NM_017094
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	NM_022215
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Ldha	lactate dehydrogenase A	NM_017025
	Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
	Lpin1	lipin 1	NM_001012111
	Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	NM_033235
	Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_012600
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
	Plin1	perilipin 1	NM_013094
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
	Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
	Psat1	phosphoserine aminotransferase 1	NM_198738
	Ptges	prostaglandin E synthase	NM_021583
	Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
	Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841

**246 días****O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0005975, GO:0006066	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
	pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	NM_001004072
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
	Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268

## 246 días

## Op Genes Infraexpresados

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501, GO:0043067	Asns	asparagine synthetase	NM_013079
	C6	complement component 6	NM_176074
	Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	NM_131902
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Ptma	prothymosin alpha	NM_021740
	tgfb3	transforming growth factor, beta 3	NM_013174
	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	NM_031353
<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006629, GO:0008610, GO:0005975, GO:0006066	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820
	Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	NM_031057
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Asns	asparagine synthetase	NM_013079
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Echs1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1	NM_078623
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
	Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	NM_031049
	Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	NM_033235
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
	pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	NM_001004072
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
	Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
	Prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	NM_023991
	Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
	Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
	Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	NM_053580
	Taldo1	transaldolase 1	NM_031811
	Tkt	transketolase	NM_022592

## 246 días

## Op Genes Sobreexpresados

<b>Metabolismo</b> GO:0009893	Il6ra	interleukin 6 receptor, subunit alpha	NM_017020
	Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)	NM_001007684
	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1	NM_130429

**ANEXO TABLA 36. Genes diferencialmente expresados, específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica, en glándula mamaria implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés.**

<b>36 días, Específicos de M<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Ref.GenBank</b>
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219	Diablo	diablo, IAP-binding mitochondrial protein	NM_001008292
	Dnase113	deoxyribonuclease 1-like 3	NM_053907
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	NM_017317
	Cd5	Cd5 molecule	NM_019295
	Id3	inhibitor of DNA binding 3	NM_013058
	Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NM_017318 NM_012992
	Npm1	numatrin	NM_012992
	Cd28	Cd28 molecule	NM_013121
	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578
	Lyz2	lysozyme 2	NM_012771
	Tp53inp1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	NM_181084
<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0002520, GO:0006955, GO:0002682, GO:0006954, GO:0042110, GO:0042113, GO:0002377, GO:0002504	Arbp	ribosomal protein, large, P0	NM_022402
	Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21	NM_001008513
	Cd19	CD19 molecule	NM_001013237
	Cd28	Cd28 molecule	NM_013121
	Cd37	CD37 molecule	NM_017124
	Cd38	CD38 molecule	NM_013127
	Cd3d	CD3 molecule, delta	NM_013169
	Cd5	Cd5 molecule	NM_019295
	Cd74	Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	NM_013069
	Cd79b	Cd79b molecule, immunoglobulin-associated beta	NM_133533
	Cd8a	CD8a molecule	NM_031538
	Coro1a	coronin, actin binding protein 1A	NM_130411
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	Hla-dma	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	NM_198741
	Hla-dmb	major histocompatibility complex, class II, DM beta	NM_198740
	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma	NM_080889
	Irf8	interferon regulatory factor 8	NM_001008722
	LOC364236	similar to 40S ribosomal protein S19	
	Lyn	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	NM_001111098
	Nme2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B)	NM_031833
	Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	NM_017317
Rbm4b	RNA binding motif protein 4B	NM_001007014	
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba	NM_001008831	
RT1-Bb	RT1 class II, locus Bb	NM_001004084	
Satb1	SATB homeobox 1	NM_001012129	
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	NM_021578	
<b>36 días, Específicos de O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados</b>			
<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006629, GO:0006066, GO:0005975	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acadsb	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	NM_013084
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Lalba	lactalbumin, alpha	NM_012594

Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_012600
Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
Pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	NM_001004072
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	NM_057135
Pfkl	phosphofructokinase, liver	NM_013190
Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	NM_053580
Taldo1	transaldolase 1	NM_031811
Tkt	transketolase	NM_022592

**36 días, Específicos de O<sub>IP</sub>  
Genes Sobreexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0005975	Eno3	enolase 3, beta, muscle	NM_012949
	Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	NM_198780
	Pfkm	phosphofructokinase, muscle	NM_031715
	Pgam2	phosphoglycerate mutase 2	NM_017328

**51 días, Comunes a M<sub>IP</sub> y O<sub>IP</sub>  
Genes Infraexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006629, GO:0008610, GO:0008610, GO:0006066, GO:0005975, GO:0006766	Acaca	acetyl-CoA carboxylase alpha	NM_022193
	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	NM_012820
	Adora1	adenosine A1 receptor	NM_017155
	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	NM_138547
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_053365
	G6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_017006
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	NM_022215
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
	Lpin1	lipin 1	NM_001012111
	Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	NM_031049
	Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	NM_033235
	Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_012600
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
	Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
	Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
	Slc27a1	solute carrier family 27 member 1	NM_053580
	Sod1	superoxide dismutase 1	NM_017050
	Taldo1	transaldolase 1	NM_031811
	Tkt	transketolase	NM_022592

**51 días, Específicos de M<sub>IP</sub>  
Genes Infraexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915	Cat	catalase	NM_012520
	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	NM_012524
	Cstb	cystatin B (stefin B)	NM_012838
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	NM_031353

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0002520, GO:0006954	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	NM_012524
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Dnase2a	deoxyribonuclease II alpha	NM_138539
	LOC364236	similar to 40S ribosomal protein S19	
	Mif	macrophage migration inhibitory factor	NM_031051
<b>Metabolismo</b> GO:0016042	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	NM_012524
	Echs1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	NM_078623
	Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
	Smpdl3a	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	NM_001005539
<b>51 días, Específicos de O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados</b>			
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0012501	C6	complement component 6	NM_176074
	Kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	NM_022264
	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	NM_013174
	Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886
<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0009892, GO:0005975, GO:0006066	Chi3l1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	NM_053560
	Hk2	hexokinase 2	NM_012735
	Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	NM_017080
	Kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	NM_022264
	Lalba	lactalbumin, alpha	NM_012594
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	NM_013174
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886	
<b>100 días, Específicos de O<sub>P</sub> Genes Infraexpresados</b>			
<b>Metabolismo</b> GO:0005975	Lalba	lactalbumin, alpha	NM_012594
	Mif	macrophage migration inhibitory factor	NM_031051
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
<b>246 días, Comunes a M<sub>IP</sub>, M<sub>P</sub>, O<sub>IP</sub> y O<sub>P</sub> Genes Infraexpresados</b>			
<b>Metabolismo</b> GO:0019752, GO:0006066, GO:0044262	Acly	ATP citrate lyase	NM_001111095
	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Chpt1	choline phosphotransferase 1	NM_001007750
	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	NM_022389
	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6	NM_134383
	Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	NM_017274
	Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_012600
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_001009399
	Pc	pyruvate carboxylase	NM_012744
	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	NM_001007620
	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	NM_053826
	Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	NM_022268
<b>246 días, Comunes a M<sub>IP</sub>, M<sub>P</sub> y O<sub>P</sub> Genes Infraexpresados</b>			
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915	Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	NM_131902
	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3	NM_013174
	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	NM_031353

<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0019752, GO:0006066, GO:0005975	Bche	butyrylcholinesterase	NM_022942
	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_001012345
	Echs1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1	NM_078623
	Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	NM_032066
	Ldhb	lactate dehydrogenase B	NM_012595
	Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	NM_033235
	Prdx6	peroxiredoxin 6	NM_053576
<b>246 días, Comunes a M<sub>IP</sub> y M<sub>P</sub></b>			
<b>Genes Infraexpresados</b>			
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0043067	Hspb1	heat shock protein 1	NM_031970
	Ldha	lactate dehydrogenase A	NM_017025
	Serpinb9	serpin peptidase inhibitor, clade B member 9	NM_001007732
<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006952, GO:0006954	Cfb	complement factor B	NM_212466
	Ddt	D-dopachrome tautomerase	NM_024131
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0006066, GO:0019752	Cdo1	cysteine dioxygenase, type I	NM_052809
	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3	NM_138877
	Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_053437
	Insig1	insulin induced gene 1	NM_022392
	Ldha	lactate dehydrogenase A	NM_017025
	Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_001145366
<b>246 días, Específicos de M<sub>P</sub></b>			
<b>Genes Infraexpresados</b>			
<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0019752	Asrg11	asparaginase like 1	NM_145089
	Ghr	growth hormone receptor	NM_017094
	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	NM_022215
	Lpin1	lipin 1	NM_001012111
	Plin	perilipin 1	NM_013094
	Psat1	phosphoserine aminotransferase 1	NM_198738
	Ptges	prostaglandin E synthase	NM_021583
<b>246 días, Específicos de O<sub>P</sub></b>			
<b>Genes Sobreexpresados</b>			
<b>Metabolismo</b> GO:0009893	Il6ra	interleukin 6 receptor, subunit alpha	NM_017020
	Klf2	Kruppel-like factor 2	NM_001007684
	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1	NM_130429

ANEXO TABLA 37. Genes diferencialmente expresados por efecto de los lípidos de la dieta, en adenocarcinomas mamarios, implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés.

M <sub>IP</sub> Genes Infraexpresados	Símbolo	Nombre	Ref.GenBank
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Jak2	Janus kinase 2	NM_031514
	Kitlg	KIT ligand	NM_021843
	Lifr	leukemia inhibitory factor receptor alpha	NM_031048
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887
	Serpinc9	serpin peptidase inhibitor, clade B member 9	NM_001007732
	Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A	NM_017064
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886	
<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0001817, GO:0002682, GO:0032943, GO:0042110, GO:0046649, GO:0046651, GO:0006952, GO:0006954, GO:0002520, GO:0042113, GO:0006955, GO:0002443, GO:0010942	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530
	Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	NM_134455
	Enpp3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	NM_019370
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Fyn	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	NM_012755
	Il18	interleukin 18	NM_019165
	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma	NM_080889
	Jak2	Janus kinase 2	NM_031514
	Kitlg	KIT ligand	NM_021843
	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	NM_021576
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887
	Serpinc1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093
	Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A	NM_017064
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886	
<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0019752, GO:0006066	Abcg1	ATP-binding cassette, subfamily G member 1	NM_053502
	Ech1	enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal	NM_022594
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Slc14a1	solute carrier family 14 member 1	NM_019346
	Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A	NM_017064
<b>M<sub>P</sub> Genes Infraexpresados</b>			
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501, GO:0043067	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Jak2	Janus kinase 2	NM_031514
	Kitlg	KIT ligand	NM_021843
	Lifr	leukemia inhibitory factor receptor alpha	NM_031048
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887
	Serpinc9	serpin peptidase inhibitor, clade B member 9	NM_001007732
	Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B	NM_022380
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886	
<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006952, GO:0006954, GO:0006955, GO:0002520, GO:0002526, GO:0002682, GO:0002684, GO:0042110, GO:0042113, GO:0046649, GO:0046651, GO:0050776	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_031530
	Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	NM_134455
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Fyn	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	NM_012755
	Il18	interleukin 18	NM_019165
	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma	NM_080889
	Jak2	Janus kinase 2	NM_031514
	Kitlg	KIT ligand	NM_021843
	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	NM_021576
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887
	Serpinc1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093
Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B	NM_022380	
<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0019752, GO:0009892	Ech1	enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal	NM_022594
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887

Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	NM_031841
Serping1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093
Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B	NM_022380
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886

**M<sub>P</sub> Genes Sobreexpresados**

<b>Metabolismo</b> GO:0006066, GO:0005975	Hk2	hexokinase 2	NM_012735
	Pfk1	phosphofructokinase, liver	NM_013190
	Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	NM_053291

**O<sub>IP</sub> Genes Infraexpresados**

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0002520, GO:0002682, GO:0006952, GO:0006954	Epas1	endothelial PAS domain protein 1	NM_023090
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Kitlg	KIT ligand	NM_021843
	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	NM_021576
	Serping1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093

<b>Metabolismo</b> GO:0006629, GO:0006796, GO:0009892, GO:0005975, GO:0019318	Abcg1	ATP-binding cassette, subfamily G member 1	NM_053502
	Acsm3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	NM_033231
	Epas1	endothelial PAS domain protein 1	NM_023090
	Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	NM_012555
	Fam129a	family with sequence similarity 129, member A	NM_022242
	Kitlg	KIT ligand	NM_021843
	Serping1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	NM_199093
Slc14a1	solute carrier family 14 member 1	NM_019346	

**O<sub>IP</sub> Genes Sobreexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0012501	Bcl10	B-cell CLL/lymphoma 10	NM_031328
	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	NM_080906
	Gja1	gap junction protein, alpha 1	NM_012567
	Jun	jun proto-oncogene	NM_021835
	Sema3a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	NM_017310

<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0006952	Bcl10	B-cell CLL/lymphoma 10	NM_031328
	Gpx2	glutathione peroxidase 2	NM_183403
	Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	NM_001004274
	Penk1	proenkephalin 1	

<b>Metabolismo</b> GO:0006066, GO:0019318	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_001177305
	Pfkm	phosphofructokinase, muscle	NM_031715
	Pgm1	phosphoglucomutase 1	NM_017033

**O<sub>P</sub> Genes Sobreexpresados**

<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0008219	Gja1	gap junction protein, alpha 1	NM_012567
	Hyal1	hyaluronoglucosaminidase 1	NM_207616
	Sema3a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	NM_017310

<b>Metabolismo</b> GO:0009893	Ccnd2	cyclin D2	NM_022267
	Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	NM_022297
	Gja1	gap junction protein, alpha 1	NM_012567

**ANEXO TABLA 38. Genes diferencialmente expresados, específicos y comunes de los grupos de dieta hiperlipídica, en adenocarcinomas mamarios, implicados en procesos biológicos significativamente sobrerrepresentados y de interés.**

<b>Específicos de M<sub>p</sub> Genes Infraexpresados</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Ref.GenBank</b>
<b>Apoptosis y Muerte Celular</b> GO:0006915, GO:0008219, GO:0010942, GO:0012501	Jak2	Janus kinase 2	NM_031514
	Lifr	leukemia inhibitory factor receptor alpha	NM_031048
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887
	Serpnb9	serpin peptidase inhibitor, clade B member 9	NM_001007732
	Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B	NM_022380
	Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	NM_012886
<b>Respuesta Sistema Inmune</b> GO:0042110, GO:0046649, GO:0050776, GO:0050778, GO:0002520, GO:0001816, GO:0001817, GO:0042113	Fyn	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	NM_012755
	Il18	interleukin 18	NM_019165
	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma	NM_080889
	Jak2	Janus kinase 2	NM_031514
	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	NM_001109887
	Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B	NM_022380
<b>Específicos de M<sub>p</sub> Genes Sobrexpresados</b>			
<b>Metabolismo</b> GO:0005975	Pfkfb3	phosphofructokinase, liver	NM_013190
	Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	NM_053291
	RGD1560402	similar to Phosphoglycerate kinase 1	