

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Lípids de la dieta i càncer de mama experimental:

Anàlisi del
metabolisme i
l'apoptosi tumoral

Maite Garcia Guasch
2023





Lípids de la dieta i càncer de mama experimental: Anàlisi del metabolisme i l'apoptosi tumoral

Memòria presentada per MAITE GARICA GUASCH per optar al grau de Doctora en Biologia.

Aquest treball s'ha realitzat sobta la direcció de la Dra. RAQUEL MORAL CABRERA en el Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, a la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, i està adscrit al programa de Doctorat de Biologia Cel·lular.

Maite Garcia Guasch

Raquel Moral Cabrera

Bellaterra, juny 2023

Agraïments

A la Dra. Raquel Moral per la seva direcció. Gràcies per la paciència i dedicació de tots aquests anys i, sobretot, per la comprensió i la flexibilitat quan ha sigut necessari.

Al Dr. Eduard Escrich per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi en el seu grup d'investigació.

Als professors i companys del Departament, gràcies per acollir-me i fer-me sentir una més.

A les meves companyes de laboratori, gràcies pels consells, els coneixements, els ànims i els riures. Per fer que cada dia fos una mica més fàcil.

À Dra. Iola Duarte pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e mostrar-me o mundo da metabolômica. Obrigada pelos conhecimentos e pelas horas dedicadas com muita paciência até ao fim da tarde. E, sobretudo, obrigada por me ter colocado Aveiro no mapa!

Aos meus colegas da Universidade de Aveiro. Obrigada pela paciência, pelos dias de agosto e fins de semana no RMN. Por me fazerem sentir parte do grupo e compreenderem o meu português.

Als meus amics i amigues per ser-hi sempre de forma incondicional i per creure sempre en mi. Quina sort més gran la meua de tenir-vos! Às minhas amigas que trouxeram-me os 25 de volta. Obrigada pelo acolhimento e pela amizade sincera e tão bonita!

A Martín, mi mejor amigo y compañero con una paciencia infinita por creer en mí y ver siempre mi mejor versión.

A la meua família, especialment als meus pares, gràcies per donar-me la oportunitat d'arribar fins aquí i recolzar-me sempre. A la Mar, la Mariona i el Gerard per mantenir la innocència, les ganes de descobrir coses noves i ser la felicitat dels dies més pesats.

ÍNDEX

ABREVIATURES	11
ABSTRACT	19
1. DESENVOLUPAMENT, ESTRUCTURA I FUNCIO DE LA GLANDULA MAMÀRIA	23
1.1 GLANDULA MAMÀRIA HUMANA.....	23
1.2. GLANDULA MAMÀRIA DE RATA.....	25
2. CÀNCER DE MAMA.....	28
2.2 ETIOLOGIA DEL CÀNCER DE MAMA	29
2.3 FACTORS IMPLICATS EN L'ETIOLOGIA DEL CÀNCER DE MAMA.....	30
2.1 PATOGÈNESI DEL CÀNCER DE MAMA	38
3. CÀNCER DE MAMA EXPERIMENTAL	39
4. LÍPIDS DE LA DIETA I CÀNCER DE MAMA: MECANISMES	41
4.1 ESTAT HORMONAL, CREIXEMENT I MADURACIÓ SEXUAL.....	41
4.2 SISTEMA IMMUNITARI	43
4.3 MODIFICACIONS DE LA MEMBRANA CEL·LULAR	44
4.4 EFECTES EN LA TRANSDUCCIÓ DE SENYALS.....	46
4.5 EFECTES EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	47
4.6 EFECTES EN L'ESTRÈS OXIDATIU	48
5. HALLMARKS DEL CÀNCER DE MAMA.....	50
5.1 APOPTOSI	50
5.2 METABOLISME DE LES CÈL·LULES TUMORALS	55
HIPÒTESI I OBJECTIUS	73
RESULTATS.....	77
ARTICLE CIENTÍFIC 1.....	77
RESULTATS NO PUBLICATS	91
ARTICLE CIENTÍFIC 2.....	97
ARTICLE CIENTÍFIC 3.....	121
DISCUSSIÓ GLOBAL	159
CONCLUSIONS.....	187
BIBLIOGRAFIA	191
ANNEX 1	215

DISSENY EXPERIMENTAL.....	215
ANNEX 2	217
DIETES	217
ANNEX 3	219
RESULTATS PREVIS SOBRE ELS PARÀMETRES DE LA CARCINOGENESI DE MODEL EXPERIMENTAL	219

ÍNDEX DE TAULES I FIGURES

Taula 1. Composició de l'oli d'oliva verge extra (OOVE).....	37
Figura 1. Desenvolupament de la glàndula mamària humana esquematitzat.	25
Figura 2. Estructures epitelials de la glàndula mamària.....	26
Figura 3. Topografia de la glàndula mamària de rata.....	27
Figura 4. Taxes estimades d'incidència estandarditzades per edats arreu del món (2020) de càncer de mama en dones de totes les edats.....	29
Figura 5. Vies de senyalització apoptòtiques	51
Figura 6. Esquema de les principals vies metabòliques reprogramades en el càncer.	56
Figura 7. Regulació del metabolisme de la glucosa.....	58
Figura 8. Regulació de la via de les pentoses fosfat	61
Figura 9. Síntesi de la serina i metabolisme d'1 carboni.	64
Figura 10. Regulació de la lipogènesi de novo en cèl·lules tumorals.	66
Figura 11. Diagrama de dispersió PCA de la fracció aquosa dels tumors	93
Figura 12. Diagrama de dispersió PCA de la fracció lipídica dels tumors	94
Figura 13. Anàlisi multivariada de la fracció lipídica dels tumors.....	95
Figura 14. Nivells relatius de diferents classes de lípids de la composició lipídica dels tumors experimentals.	96

Abreviatures

α-KG	α -Cetoglutarat
3PG	3-Fosfoglicerat
Abs	Alveolar buds
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACLY	ATP-citrar liasa
ACO2	Aconitasa 2
ACSS1/2	Acetil-CoA sintetasa 1/2
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AIF	Factor inductor de l'apoptosi
ALDOA	Aldolasa A
AMPK	Proteïna quinasa activada per monofosfat d'adenosina 5'
APAF-1	Factor activador de la proteasa apoptòtica 1
ATGL	Lipasa de triacilglicèrids
ATP	Adenosine triphosphate
Bak	Antagonista homòleg de Bcl-2
Bax	Proteïna X associada a Bcl-2
BCAA	Aminoàcids de cadena ramificada
BCAT1/2	Aminotransferasa ramificada 1/2
BCKA	Cetoàcids de cadena ramificada
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1/2	Breast cancer 1/2
CACT	Carnitina acilcarnitina translocasa
CD36	Clúster de diferenciació 36
CHEK2	Checkpoint kinase 2
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CPT1/2	Carnitina-palmitoïl transferasa

CS	Citrat sintasa
DAG	Diacilglicerol
DISC	Death-inducing signaling complex
DMBA	7,12-dimetilbenz(α)antracè
E1	Estrona
E2	Estradiol
ER	Receptor d'estrògens
ETC	Cadena de transport d'electrons
F6P	Fructosa-6-fosfat
FABP4	Proteïna d'unió als àcids grassos 4
FADD	Proteïna del domini de mort associada al receptor Fas
FADH	Dinucleòtid de flavina i adenina
FASN	Sintasa d'àcids grassos
FATPs	Proteïnes transportadores d'àcids grassos
FFA	Àcids grassos lliures
FH	Fumarat hidratasa
FPP	Farnesil pirofosfat
G3P	Gliceraldehid-3-fosfat
G6P	Glucosa-6-fosfat
G6PDH	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
Gln	Glutamina
GLS1/2	Glutaminasa 1/2
GLUT	Transportador de glucosa
GnRH	Hormona alliberadora de gonadotropines
GPx	Glutatió peroxidasa
GSH	Glutatió
HIP-1α	Factor induïble per hiòxia 1 α

HK2 Hexoquinasa-2

HMG-CoA 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A

HMGR HMG-CoA reductasa

HRMAS High-resolution magic angle spinning

HSL Lipasa sensible a hormones

HT Hidroxitirosol

IAP Inhibidor de l'apoptosi

IDH Isocitrat deshidrogenasa

IP3 Inositol-trifosfat

LDHA Lactat deshidrogenasa

LDL Lipoproteïnes de baixa densitat

LUT Luteolina

LXR Liver X receptor

MAPK Proteïna quinasa activada per mitògens

MCT Transportador de monocarboxilats

MGL Lipasa de monoacilglicerols

MPT Porus de transició de la permeabilitat mitocondrial

mTOR Mammalian target of rapamycin

MUFA Àcids grassos monoinsaturats

NAD(P)H Dinucleòtid (fosfat) de nicotinamida i adenina

NEAA Aminoàcids no essencials

NFkB Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NMU N-nitrosomemetilurea

NRF2 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OLE Oleuropeïna

OOVE Oli d'oliva verge extra

OXPHOS Fosforilació oxidativa

PDK1	Piruvat deshidrogenasa
PFK1	Phosphofruktokinase 1 or muscle type
PFKL	Phosphofruktokinase, Liver Type
PGD	6-Fosfogluconat deshidrogenasa
PGE2	Prostaglandina E2
PHGDH	Fosfoglicerat deshidrogenasa
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PIDL	Proliferacions intraductals
PK	Piruvat quinasa
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPP	Via de les pentoses fosfat
PR	Receptor de progesterona
PSAT1	Fosfoferina aminotransferasa
PSPH	Fosfoferina fosfatasa
PTEN	Homòleg de la fosfatasa i la tensina
PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
R5P	Ribosa-5-fosfat
RMN	Ressonància magnètica nuclear
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RXR	Retinoid X receptor
S1P	Esfingosina-1-fosfat
SAM	S-adenosilmetionina
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SCD1	Estearoil-CoA desaturasa 1
SDH	Succinat deshidrogenasa
SFA	Àcids grassos saturats
SOD	Superòxid dismutasa

SREBP Sterol-regulatory element-binding protein

STAT3 Transductor de Senyal i Activador de la Transcripció 3

TALDO Transaldolasa

TCA Cicle de l'acid cítric

TD Terminal ducts

TDLU Terminal ductal lobular unit

TEBs Terminal end buds

TIGAR TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator

TKT Transcetolasa

TNF Factor de necrosi tumoral

TNFR1 Receptor del factor de necrosi tumoral

TRADD Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

TRAF2 Factor 2 associat al receptor de TNF

TRx Tioredoxina

UCP2 Uncoupling protein 2



ABSTRACT

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common malignant tumor in women worldwide, with diet, and especially dietary lipids, having an etiological role. We have previously observed a differential effect of high-fat diets on experimental mammary carcinogenesis (clearly stimulating from the high-corn oil diet, with a weak influence from the high-extra virgin olive oil -EVOO- diet), through different mechanisms such as modifications in the expression of metabolism and/or apoptotic genes. Metabolic reprogramming and apoptosis avoidance are crucial hallmarks of cancer development.

The main goal of this thesis was to investigate the effect of high-fat diets and their components on experimental mammary carcinogenesis and elucidate the mechanisms involved, especially in metabolism and apoptosis, through *in vivo* and *in vitro* approaches. For the *in vivo* studies, the experimental model of mammary cancer induced with DMBA in rats was used. Animals were fed with a low-fat diet (LF), with a high corn oil diet from weaning (HOO) or after induction (LF-HCO), and with a high EVOO diet from weaning (HOO) or after induction (LF-HOO). Data from carcinogenesis and anatomopathological parameters to validate and extend results regarding the differential effect of high-fat diets on carcinogenesis was used. Tumor molecular analysis was performed at mRNA, protein, or enzymatic levels, and metabolome was characterized by ¹H-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Regarding the *in vitro* assays, two cell lines representing different molecular subtypes of breast cancer (MDA-MB-231 and MCF-7) were used. The effects of different oil components on viability, apoptosis and metabolomic profile were determined.

Tumor molecular analysis of enzymes of the main metabolic pathways has shown that the EVOO-enriched diet increased glucose and mitochondrial metabolism. This metabolic reprogramming did not reflect clinical and morphological characteristics of tumors (lower degree in the EVOO groups). This data suggested that metabolic changes without the context of other pathways, such as proliferation or apoptosis, may not reflect tumor malignancy. Further analysis using untargeted metabolomics showed changes in tumor lipid

Abstract

composition. The high corn oil diet (rich in polyunsaturated fatty acids -PUFA- n-6) increased total PUFA and linoleic acid while decreasing monounsaturated fatty acids (MUFA). On the contrary, tumors from high EVOO groups were similar to those of the control group. These differences were concordant with the different effect of diets on carcinogenesis, suggesting that tumor lipid composition play a role in malignancy. Moreover, the levels of apoptotic proteins in the tumors were studied, finding that the high-EVOO diet modulated several cell death pathways. This suggested that EVOO may exert a beneficial effect modulating apoptosis.

Secondly, in vitro analyses were designed to elucidate the role of the components of high-fat diets. The treatment of MDA-MB-231 and MCF-7 cells with polyphenols (Hydroxytyrosol -HT-, Luteolin -LUT- and Oleuropein) diminished cell viability and increased apoptosis, whereas fatty acids treatment (oleic and linoleic acid) had no significant effect. Next, changes in BC cell metabolome induced with HT and LUT were characterized, revealing extensive metabolic reprogramming. Although some effects were observed in both cell lines, others were markedly depending on the type of cell, underscoring the significance of metabolic context in cancer metabolomics studies.

In summary, the results suggest a beneficial effect of EVOO on breast cancer risk and disease progression, through multiple mechanisms like the modulation of metabolism and favoring a pro-apoptotic environment in the tumors. These effects would be mediated by various components, especially the minor compounds, which highlight the importance of the type but also the quality of the oil consumed. The relevance of nutritional factors is that they are modifiable, which highlights the importance of improving dietary habits, especially in relation to lipid intake, in the prevention and fight against breast cancer.



INTRODUCCIÓ

1. Desenvolupament, estructura i funció de la glàndula mamària

El desenvolupament i la funció de la glàndula mamària, sigui d'humana o de rata, depèn de factors hormonals múltiples i específics que actuen directament o indirectament sobre les cèl·lules diana, components de la matriu extracel·lular i factors de creixement produïts localment. A continuació es presenten les característiques diferencials del desenvolupament de la glàndula mamària humana i la de rata.

1.1 Glàndula mamària humana

En humans, la formació de l'estructura tubular de la glàndula mamària s'inicia cap a les sis setmanes d'embaràs a partir de l'ectoderm. En néixer, la glàndula mamària consisteix en un sistema senzill ramificat de ductes que romanen en estat quiescent fins a la pubertat ¹.

Durant la pubertat, poc abans de la menarquia, juntament amb l'inici de la maduració fol·licular a l'ovari, la parènquima mamària comença a desenvolupar ductes mamaris primaris i secundaris que finalitzen amb unes formacions bulboses. En el moment de les primeres ovulacions s'inicia la segona fase del desenvolupament mamari, la formació dels lòbuls. Les formacions bulboses deriven en la formació de ductes secundaris que es disposen al voltant d'un ducte inicial, formant els lòbuls tipus 1, la unitat funcional bàsica de la mama humana o la unitat ducto-lobular terminal (en anglès *terminal ductal lobular unit* o TDLU). A partir d'aquesta estructura primària, es produirà la transició de forma gradual a estructures més diferenciades, els lòbuls tipus 2 i 3 ².

La diferenciació de la mama com a glàndula lobular es completa després de la menarquia, tot i que segueix un ritme relacionat amb els estímuls hormonals durant cada cicle menstrual i, en especial, l'embaràs ³. A cada cicle menstrual, durant la fase fol·licular i preovulatòria, les estructures glandulars creixen arribant al màxim durant la fase lutea i a continuació es produeix una ràpida involució. El balanç entre la proliferació i la involució en edats reproductives primerenques afavoreix la proliferació degut a l'augment del número de cèl·lules en cada cicle ovulatori ⁴.

Introducció

Els canvis cíclics en els nivells d'estrògens i progesterona ovàrics durant cada cicle menstrual i la seva acció sinèrgica son necessaris per al creixement harmònic de la glàndula mamària ¹. Al mateix temps hi intervenen altres hormones com la prolactina, la insulina, el cortisol, la tiroxina, l'hormona del creixement i l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH) ⁵. El teixit adipós mamari influeix significativament sobre el creixement i el desenvolupament de l'epiteli glandular, de tal manera que és necessària la interacció entre ambdós teixits perquè es produeixi la morfogènesi mamària ⁶.

La mama adulta normal consta de 15 a 25 ductes galactòfors que drenen els lòbuls mamaris, formats per nombrosos lòbuls petits. Aquests lòbuls petits estan formats per un ducte terminal intralobular i múltiples ductes rodejats per teixit connectiu intralobular i perilobular. Els ductes galactòfors neixen del mugró i es ramifiquen en conductes més prims que condueixen fins als lòbuls petits ¹. Durant l'embaràs es produeix l'expansió plena del sistema lòbuloalveolar necessari per a la secreció de llet. Al llarg de la gestació l'epiteli glandular prolifera, es desenvolupa i es vascularitza, apareixent els lòbuls tipus 3 i posteriorment els tipus 4, amb capacitat secretora i que representa l'estat màxim de diferenciació de la glàndula ⁵. El creixement inicial depèn d'estrògens i progesterona en presència de prolactina. Es requereix l'acció d'altres hormones, com glucocorticoides, hormona de creixement (GH), tiroxina, insulina i d'altres factors de creixement. Durant la gestació, els estrògens i la progesterona inhibeixen a nivell perifèric l'acció de la prolactina, impeding la seva acció lactogènica. Després del part, amb l'eliminació de la placenta, els nivells d'estrògens i progesterona disminueixen permetent l'acció lactogènica de la prolactina. Durant el període de lactància, la succió del nadó provocarà un reflex per a la secreció de prolactina i d'oxitocina. En finalitzar la lactància, la glàndula mamària interromp la seva activitat secretora i pateix una fase de regressió. Dins de l'epiteli alveolar es desenvolupa una important activitat autofàgica i lisosomal que elimina les restes cel·lulars. La majoria dels lòbuls tipus 4 retornen a lòbuls tipus 2 i 3, essent aquesta l'estructura predominant en les mames de les dones premenopàusiques múltiples ⁶.

Després de la menopausa, la caiguda de les hormones ovàriques (estradiol i progesterona) provoca la involució progressiva dels teixits epitelial i connectiu i

Introducció

l'atròfia del component ductolobular. La majoria dels lòbuls petits adquireixen la morfologia dels lòbuls tipus 1 presentant una activitat proliferativa més baixa en les dones múltiples que en les nul·líparaes. Aquest fet, indica que la gestació pot deixar canvis permanents en les característiques biològiques d'aquestes estructures ⁵.

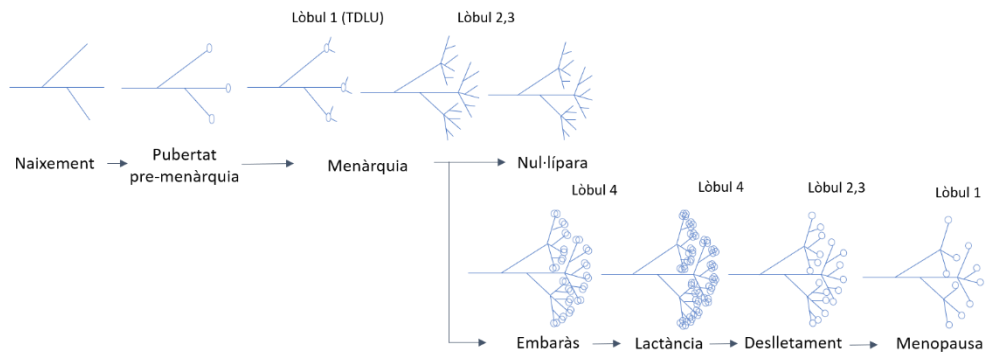


Figura 1. Desenvolupament de la glàndula mamària humana esquematitzat.

1.2. Glàndula mamària de rata

A diferència dels humans, la rata posseeix sis parells de glàndules mamàries: un parell a la regió cervical, dos a la regió toràcica, dos a l'abdominal i un a la inguinal ⁷.

El desenvolupament de la glàndula mamària s'inicia sobre l'onzè dia de gestació com a estructures allargades de l'ectoderm, que posteriorment es desenvoluparan, exclusivament en femelles, com a ductes galactòfors primordials ⁸. En la rata Sprague-Dawley, la glàndula mamària evoluciona des d'un ducte galactòfor major principal que neix del mugró i es ramifica en ductes secundaris. Aquests ductes secundaris aniran creixent i ramificant-se al llarg de la vida de l'animal. Cap a la segona setmana de vida, la glàndula mostra ductes amb ramificacions que finalitzen amb bulbs terminals o *terminal end buds* (TEBs), equivalents a les TDLU humanes, i considerats els centres de creixement actiu. El nombre de TEBs màxim s'assoleix als 21 dies d'edat. A partir d'aquí, coincidint amb el període prepuberal i l'inici de l'activitat ovàrica, els TEBs inicien la diferenciació i septació a 3-5 bulbs alveolars (o *alveolar buds*, ABs). Aquesta diferenciació progressiva s'accentuarà a cada cicle estral. Els ABs paral·lelament i durant els cicles estrals, comencen el desenvolupament lobular amb l'aparició de lòbuls tipus 1 i 2, procés que continua durant la maduració sexual ⁹. Un número elevat de TEBs pateix hipoplàsia construint ductes terminals (TDs). Així, en augmentar l'edat

Introducció

de l'animal, disminueix el número de TEBs i augmenta el dels TDs, mentre que el número d'ABs i lòbuls 1 romandrà estable o disminuirà discretament cap als 180 dies d'edat de l'animal⁷. De forma similar a la glàndula humana, en femella no gestant el desenvolupament depèn d'hormones ovàriques, estrògens (responsables fonamentalment del creixement dels ductes) i progesterona (responsable fonamentalment del desenvolupament lòbul-alveolar), amb la participació d'altres hormones com la GH, insulina, prolactina i factors de creixement.

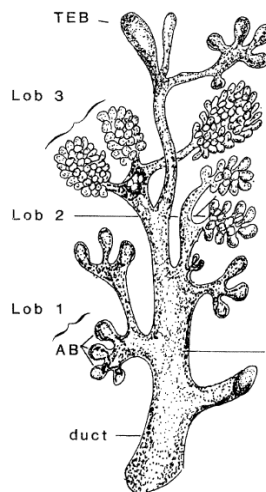


Figura 2. Estructures epitelials de la glàndula mamària. Imatge de Russo&Russo⁹.

Des del punt de vista histològic, la parènquima mamària de la rata està constituït per uns conductes rectes que es ramifiquen, rodejats per teixit conjuntiu lax i fibroadipós. Els ductes estan revestits per dues capes de cèl·lules (una interna epitelial i una externa mioepitelial) mentre que els TEBs estan constituïts per 4 o 6 capes de cèl·lules cuboidals epitelials que presenten un elevat índex de proliferació⁷.

La topografia de la glàndula mamària indica que existeixen diferents àrees que difereixen en la seva morfologia, característiques cinètiques, resposta a estímuls hormonals i potencial carcinogènic⁹. Aquestes àrees són fruit de la divisió en tres parts de la parènquima mamària a través de l'eix longitudinal. La zona A és la més propera al mugró i és on es troben els ductes galactòfors principals i secundaris. La zona B correspon a les ramificacions dels ductes anteriors i per últim, la zona C és rica en estructures ductals terminals que acaben amb TEBs i TDs. Durant la maduració a ABs,

Introducció

disminueix marcadament el número de TEBs a les zones A i B, on predominen els lòbuls petits i els ABs, respectivament, però no en la zona C. Tot i que totes les glàndules mamàries estan constituïdes per les tres zones descrites, la quantitat i la mida de cada una de les estructures morfològiques i l'àrea glandular difereixen segons la localització i anatòmica. Les glàndules toràciques tenen més TEBs i més grans que les abdominals que mostren una diferenciació més lenta ⁸. Aquesta diferència desapareix amb l'edat de tal manera que ambdues glàndules acaben presentant el mateix grau de desenvolupament observat en la resta de localitzacions topogràfiques ⁷.

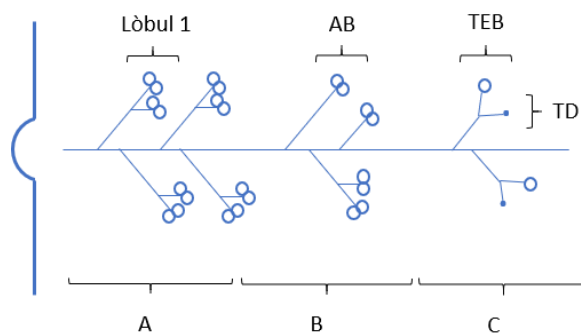


Figura 3. Topografia de la glàndula mamària de rata.

A la glàndula mamària de rata, igual que en la humana, els lòbuls petits maduren a partir d'estructures menys complexes, els lòbuls tipus 1 (amb 5-15 ductes) a lòbuls tipus 2 (amb 40-60 ductes) i tipus 3 (amb més de 65 ductes) ⁷. El desenvolupament glandular dependrà de diferents factors, com per exemple, el número de cicles transcorreguts, la dieta i les característiques genètiques específiques de l'animal, però la diferenciació completa s'assoleix amb l'embaràs i la lactància. Durant la gestació diferents estímuls hormonals (estrògens, progesterona, prolactina, inhibina, a més de hCG i hPL produïdes per l'embrió), contribueixen al desenvolupament de la glàndula ⁵. Els lòbuls durant la gestació i la lactància són lòbuls del tipus 3 i 4 i aquesta diferenciació es produeix de manera més accentuada a la zona A que a la B. Els animals que han completat la gestació, que dura tres setmanes, també mostren un desenvolupament lobular extens a la zona C ⁸.

La lactància, que també dura unes tres setmanes, retrasa la reiniciació del cicle estral i l'ovulació. Un cop acabada la lactància, i amb la caiguda dels nivells de prolactina, la

Introducció

glàndula mamària pateix una involució però la seva arquitectura romandrà permanentment modificada i per tant, presentarà un gran nombre d'ABs i lòbuls petits. S'ha descrit que als 40-42 dies post-deslletament les glàndules de una rata múltipara, en comparació amb les d'una nul·lípara, no tenen TEBs i ocasionalment TDs. El número d'ABs és similar mentre que el de lòbuls petits és aproximadament 4 vegades superior que el d'una rata verge adulta ⁹.

2. Càncer de mama

El càncer de mama és una malaltia amb una elevada incidència, prevalença i mortalitat arreu del món. És la neoplàsia maligna més freqüent entre dones i la responsable d'aproximadament 2,3 milions de neoplàsies diagnosticades. Representa 1 de cada 4 càncers i 1 de cada 6 morts per càncer, posicionant-se com el càncer amb més incidència i la primera causa de mort per càncer entre les dones en la gran majoria de països ¹⁰.

A nivell mundial l'any 2020, les taxes d'incidència del càncer de mama més altes corresponien a les poblacions d'Austràlia i Nova Zelanda, d'Europa Occidental (entre els que destaca Bèlgica amb la incidència més alta del món), d'Amèrica del Nord i Europa del Nord mentre que les taxes més baixes eren les d'Amèrica Central, Àfrica oriental i central i Àsia central-sud ¹⁰. Pel que fa la incidència del càncer de mama a Espanya, és més baixa que altres països Europeus però segueix sent el càncer amb més incidència i mortalitat entre les dones (www.gco.iarc.fr). Durant el 2022 la incidència va ser prop d'uns 35.000 nous casos que representen el 28,9% dels càncers diagnosticats en dones, i s'estima que la incidència augmenta un 0,9% per any ¹¹. A Catalunya la incidència d'aquesta malaltia ha augmentat en els últims anys i segueix amb aquesta tendència ¹¹.

Introducció

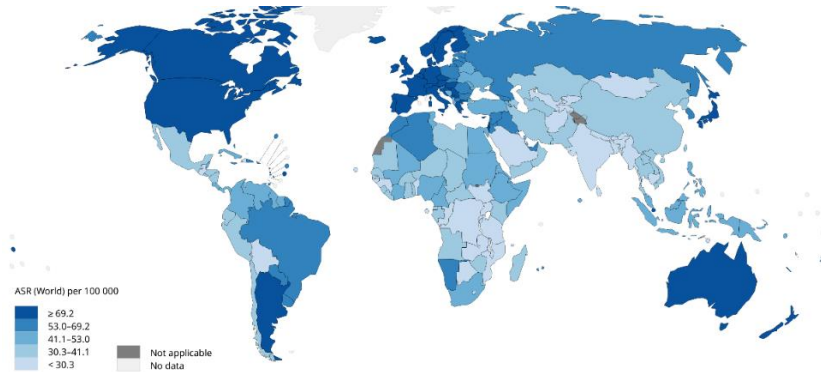


Figura 4. Taxes estimades d'incidència estandarditzades per edats arreu del món (2020) de càncer de mama en dones de totes les edats (www.gco.iarc.fr).

2.2 Etiologia del càncer de mama

Segons la classificació de l'Organització Mundial de la Salut, el càncer de mama es pot dividir entre sarcomes i carcinomes. Els sarcomes s'inicien en el teixit connectiu, vasos sanguinis i miofibroblasts, i els carcinomes en les cèl·lules epitelials. Els carcinomes són el tipus més freqüent, i es poden classificar en carcinoma *in situ*, quan les cèl·lules tumorals no surten dels ductes (*in situ* ductal) o en els lòbuls (*in situ* lobular), o carcinomes invasius, amb alta capacitat metastàtica¹². Molecularment, s'han identificat diferents marcadors que han permès classificar els carcinomes segons la seva expressió. Els tumors Luminal A presenten el receptor d'estrògens (ER), el receptor de progesterona (PR) i absència de l'HER2. Aquest subtipus presenta l'activació de gens amb característiques de l'epiteli luminal dels ductes mamaris i baixa expressió de gens relacionats amb la proliferació. Clínicament són de baix grau de malignitat, proliferen lentament i acostumen a tenir el millor pronòstic. Els tumors Luminal B també són ER positius però poden ser PR negatius i/o HER2 positius. Es relacionen amb l'expressió de gens de proliferació i són més diferenciats de l'epiteli luminal que els esmentats anteriorment¹³. Tan els Luminal A com els Luminal B es consideren tumors homonodependents perquè el creixement i la regulació de les vies cel·lulars depenen, en part, de l'acció de les hormones¹⁴. Els tumors HER2 són positius per aquest receptor i negatius per ER i PR. Sobreexpressen principalment gens relacionats amb la proliferació i per tant, són tumors que proliferen més ràpid que els luminals. Acostumaven a tenir el pitjor pronòstic però s'han desenvolupat teràpies dirigides a HER2 que l'han millorat. Per últim, els tumors triple negatius presenten absència dels receptors ER, PR i HER2, són els més agressius i presenten el pitjor

Introducció

pronòstic ¹³. Aquests dos últims subtipus són tumors hormonoindependents perquè les vies de regulació no depenen de l'acció de les hormones, ja que, no presenten els seus receptors ¹⁴. La caracterització molecular dels tumors és de gran importància clínica, vist que l'eficàcia dels tractaments dependrà de l'expressió dels receptors esmentats ¹⁵.

2.3 Factors implicats en l'etiologia del càncer de mama

El càncer de mama és un procés neoplàsic que es produeix principalment a les cèl·lules epitelials dels ductes o en les dels lòbuls i és una malaltia d'etiologia multifactorial ¹⁶. És a dir, diversos factors que actuen de forma interdependent (simultàniament i/o seqüencialment) regulen les diferents etapes de la carcinogènesi mamària. La naturalesa d'aquests factors és variada però es poden agrupar en tres grups: factors endocrins, factors genètics i epigenètics, i factors ambientals o estil de vida.

2.1.1 Factors genètics i epigenètics

En condicions normals els processos cel·lulars de proliferació, diferenciació i mort cel·lular es troben estrictament regulats per assegurar la formació, el manteniment de la funció i la reparació dels teixits i òrgans de l'organisme. Els principals responsables de mantenir-ho són els protooncogenes, gens supressors, gens del cicle cel·lular, gens reparadors de l'ADN o gens reguladors de l'apoptosi. La carcinogènesi és un procés complex que resulta, principalment, de l'acumulació d'alteracions en l'estructura d'aquests gens (canvis genètics) o modificacions que influeixen el seu comportament (canvis epigenètics), que són la base dels mecanismes moleculars del càncer ¹⁴. Aquestes alteracions inclouen l'activació d'oncogenes, són alteracions dominants, i la inactivació dels gens supressors, normalment es recessiva i requereix de l'anul·lació completa de la funció o absència de la proteïna funcional ¹⁷.

Les proteïnes codificades pels protooncogenes participen en vies de transducció de senyals mitogèniques i poden ser factors de creixement (com PDGF), receptors de membrana dels factors de creixement (EGFR o HER2), proteïnes citoplasmàtiques transductores de senyals (HRas) o factors de transcripció (Myc, Fos, Jun) ¹⁷. Els oncogenes participen en les diferents etapes de la carcinogènesi, cooperant entre ells per conduir a les cèl·lules cap a la transformació tumorigènica. D'altra banda, els gens supressors codifiquen per proteïnes que controlen el cicle cel·lular inhibint la

Introducció

proliferació, induint a les cèl·lules a la mort programada i/o participant en la reparació de les lesions de l'ADN. Són gens freqüentment alterats en el càncer de mama i codifiquen per proteïnes com PTEN, p53, Rb, diferents ciclines, proteïnes de les vies de reparació (BRCA1 i BRCA2) i diferents proteïnes apoptòtiques ¹⁸.

Aquestes mutacions en protooncogens i/o supressors de tumors confereixen a les cèl·lules unes característiques que l'any 2000 van ser anomenades *Hallmarks* del càncer. En total s'han descrit vuit capacitats essencials; 1) autosuficiència en el creixement; 2) insensibilitat a factors inhibidors del creixement; 3) evasió de l'apoptosi; 4) potencial de replicació il·limitat; 5) evasió del sistema immune; 6) reprogramació del metabolisme tumoral; 7) angiogènesi sostinguda i 8) invasió de teixits i metastasi. A part, s'ha descrit dues capacitats potencials; el desbloqueig de la plasticitat fenotípica i la senescència cel·lular. En revisions posteriors, s'ha atribuït dues capacitats facilitadores de la supervivència cel·lular com la inestabilitat genòmica i la promoció de la inflamació tumoral. Actualment, es proposen dues capacitats facilitadores noves, la reprogramació epigenètica i la variabilitat del microbioma ^{19,20}.

La majoria dels càncers de mama són d'origen esporàdic però el 5-10% presenten un component hereditari, és a dir, s'hereta l'alteració en un gen supressor per via germinal que comporta la predisposició a patir aquesta malaltia ²⁰. Els factors de susceptibilitat al càncer de mama identificats fins ara es poden estratificar segons el perfil de risc en tres nivells: gens d'alta, intermèdia i baixa penetrància associats a un nivell d'elevat, intermedi o baix risc a desenvolupar la malaltia ²¹. Actualment, els gens d'alta penetrància descoberts són BRCA1, BRCA2 (de l'anglès *Breast Cancer 1 or 2*), TP53 (de l'anglès *tumor protein p53*), PTEN i LKB1 (de l'anglès *liver kinase B1*) ²². La mutació d'un dels gens en una cèl·lula germinal s'hereta de manera autosòmica dominant adquirint un risc elevat a desenvolupar càncer en heretar l'al·lel mutat. BRCA1 i BRCA2 són gens supressors de tumors que controlen el cicle cel·lular. BRCA1 està implicat en el control del cicle cel·lular i danys de l'ADN i l'absència de la proteïna provoca que el cicle cel·lular no pari a G2 en situacions de dany a l'ADN i continuï la proliferació sense mecanismes de reparació. La mutació d'aquest gen s'associa amb un càncer de mama de la classe basal negatiu per els receptors ER, PR i Her2 i amb mutacions a TP53 ²³. Les mutacions en BRCA2 s'associen a un elevat risc de càncer de

Introducció

mama en homes. Els tumors que presenten mutacions en aquests gens acostumen a expressar ER, PR i Her2 i són de grau histològic menor que els causats per la mutació en el gen BRCA1 ^{23,24}.

2.1.2 Factors endocrins

L'etiologia i progressió del càncer de mama té un important component hormonal, amb un paper destacat de les hormones ovàriques. Certs factors de risc del càncer de mama esporàdic es relacionen amb les hormones endògenes produïdes pels ovaris, els estrògens i la progesterona. Els estrògens a concentracions fisiològiques, així com concentracions elevades de progesterona i d'altres hormones (prolactina, insulina i d'altres) estimulen la proliferació dels tumors mamaris. Factors que incrementen la duració i/o els nivells d'exposició d'aquestes hormones que estimulen la proliferació cel·lular s'han associat amb un increment del risc de desenvolupar la malaltia. Entre aquests factors reproductius es troben la menarquia precoç, la menopausa tardana, l'edat tardana del primer embaràs o la nul·liparitat ²⁵. L'embaràs té un efecte protector si precedeix a la transformació de la glàndula mamària, i un efecte estimulador si és posterior ²⁶. L'efecte protector de l'embaràs es relaciona amb la diferenciació de la glàndula mamària i una menor proliferació de les cèl·lules epitelials ¹⁴. D'altra banda, en dones postmenopàusiques i obeses l'aromatasa del teixit adipós converteix els andrògens suprarenals a estrògens i aquest fet, entre d'altres, podria explicar el major risc d'aquestes dones a desenvolupar càncer de mama. Per tant, l'exposició perllongada als estrògens sembla ser un factor crític en el desenvolupament d'aquesta malaltia ²⁷.

Clàssicament s'ha considerat que els estrògens tenen un paper important en la promoció del tumor perquè estimulen la proliferació del teixit epitelial mamari però alguns treballs també els han relacionat amb la iniciació tumoral ²⁸. El mecanisme exacte pel qual s'inicia el càncer és encara desconegut. A nivell morfològic, es produeixen un conjunt de lesions i modificacions genètiques que porten la glàndula mamària a la neoplàsia ¹³. A nivell cel·lular, el model de l'evolució clonal, on s'acumulen mutacions, canvis epigenètics i sobreviuen les cèl·lules més adaptades, i el model de les cèl·lules mare cancerígenes, on una cèl·lula mare inicia i sosté la progressió, actuarien conjuntament. A nivell molecular, hi ha evidències que el càncer de mama

Introducció

evoluciona seguint dos camins divergents, principalment relacionats amb l'expressió del receptor d'estrògens (ER), el grau tumoral i la proliferació¹⁴. Els mecanismes d'acció dels estrògens a les cèl·lules es poden classificar en respostes genòmiques i no genòmiques. Els estrògens interactuen amb els seus receptors intracel·lulars i transloquen al nucli on regulen l'expressió gènica de diferents gens de resposta ràpida com per exemple c-fos, c-jun i c-myc, gens implicats en la proliferació i diferenciació cel·lular. Pel que fa a les respostes no genòmiques dels estrògens, aquestes hormones en unir-se als seus receptors poden activar l'activitat de proteïnes quinasas involucrades també en vies de proliferació cel·lular²⁹. Estudis *in vivo* ha demostrat que l'estradiol (E2), l'estrone (E1) i alguns dels seus metabòlits són carcinogènics. L'exposició continuada a E2/E1 s'associa amb el desenvolupament del càncer de mama mitjançant dues vies d'actuació complementaries que intervenen en la iniciació, la promoció i la progressió de la malaltia. Una via implica l'activació de les vies de proliferació mitjançant la unió dels estrògens als seus receptors mentre que l'altra, implica la capacitat oxidativa dels metabòlits dels estrògens i els danys causats a l'ADN³⁰.

El receptor d'estrògens és un dels biomarcadors més utilitzats per a la classificació del càncer de mama i com a factor pronòstic i predictiu. Estudis epidemiològics suggereixen que un 80% dels càncers de mama són positius per aquests marcador (ER+) i són tumors diferenciats, menys agressius i amb millor pronòstic que els ER-³¹. S'han identificat dos classes de receptors d'estrògens; ER- α i ER- β que presenten una elevada homologia però diferents propietats d'unió a l'ADN i al lligand i uns patrons d'expressió tissular lleugerament diferents. En el càncer de mama l'ER- α es relaciona amb la proliferació cel·lular i la supervivència, ja que, és el principal mediador endogen i d'acció ràpida d'E2. En canvi, el paper d' ER- β en la proliferació mediada per E2 encara no està clar tot i que estudis recents apunten que podria actuar com un supressor tumoral modulant els efectes d'ER- α . Alguns estudis en humans han destacat un augment d'ER- α en la transició de teixit normal a maligne mentre que els nivells d'ER- β disminueixen durant la progressió de la malaltia^{28,32,33}.

L'acció de la progesterona és mediada pel seu receptor PR, del qual s'han descrit dues isoformes codificades per un mateix gen a partir de promotors diferents; PR-A i PR-B.

Introducció

En condicions normals, PR-A i PR-B s'expressen a nivells semblants en el teixit epitelial de la mama però s'ha observat un desequilibri en lesions premalignes o en el desenvolupament del càncer. Aquest desequilibri incrementa a mesura que la lesió augmenta la seva malignitat ³⁴. Estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que la sobreexpressió de PR-A indueix un fenotip carcinogènic que implica la disminució de l'adhesió cel·lular, increment de la migració, hiperplàsia dels ductes i estructures desorganitzades en la membrana basal ¹⁵. En general, la síntesi de progesterona i l'expressió de PR-B són de bon pronòstic, mentre que la pèrdua de progesterona o una elevada expressió de PR-A indiquen major agressivitat tumoral i una major probabilitat de metàstasi ³⁵.

2.1.3 Factors ambientals

Les diferències geogràfiques en incidència i mortalitat del càncer de mama indiquen que, a més dels factors genètics i endocrins, han d'existir altres factors de tipus ambiental i d'estil de vida en l'etiologia d'aquesta malaltia ³⁶. La incidència del càncer de mama és major en països desenvolupats en comparació amb països en vies de desenvolupament però la mortalitat en aquests últims països és un 17% superior. Les dones dels països desenvolupats tenen fills més tard, el temps de lactància materna és inferior i també s'adopten canvis en la dieta que juntament amb la reducció de l'exercici físic afavoreixen l'augment de pes. D'altra banda, en aquests països hi ha programes de detecció i prevenció que afavoreixen el diagnòstic en etapes inicials de la malaltia, incrementant l'eficiència de les teràpies i la supervivència de les dones diagnosticades ¹⁰. En relació als factors relacionats amb l'estil de vida, hi ha evidències que l'alimentació, l'activitat física o el pes corporal tenen un gran impacte en el desenvolupament d'aquesta malaltia ³⁷.

Pel que fa a l'exercici, l'activitat física ha demostrat tenir un efecte protector sobre el risc de desenvolupar càncer de mama. Alguns dels factors associats a aquest efecte és la disminució dels nivells d'estradiol i insulina, així com la disminució de la inflamació sistèmica ³⁸. Un dels factors també molt relacionat amb el risc de càncer de mama, que en molts casos deriva de l'equilibri entre ingesta i despesa energètica, és el pes corporal. En aquest sentit, s'ha descrit que l'obesitat en dones postmenopàusiques és

Introducció

un factor de risc, en part, perquè el teixit adipós es comporta com un productor perifèric d'estrògens, i sintetitza diverses molècules proinflamatòries ³⁹.

Pel que fa a la dieta, diversos estudis epidemiològics i, sobretot experimentals, han mostrat un efecte dels factors nutricionals en el desenvolupament d'aquesta malaltia. Es coneix que els canvis en la seva composició poden afectar al creixement i progressió tumoral, alterant la disponibilitat dels nutrients i com les cèl·lules tumorals els utilitzen per mantenir el creixement i la supervivència ⁴⁰. Diferents treballs han estudiat l'efecte de les dietes en el càncer i els resultats són diversos. En general, les dietes baixes en hidrats de carboni, amb restricció calòrica, dietes cetogèniques o amb la deprivació d'algun aminoàcid (serina, glicina o metionina) han mostrat disminuir el creixement tumoral en models experimentals *in vivo* i, en canvi, les dietes hiperlipídiques han demostrat afavorir la proliferació tumoral ⁴¹⁻⁴³. Quan s'ha estudiat les diferents classes de greixos per separat, les evidències suggereixen que un alt consum de greixos saturats o de poliinsaturats (PUFA) n-6 incrementen el risc de càncer de mama, mentre que pel consum de PUFA n-3 s'ha descrit un paper protector i pels MUFA un efecte potencialment protector, sobretot quan la font principal és l'oli d'oliva verge extra (OOVE) ⁴⁴⁻⁴⁶. Diferents estudis epidemiològics han descrit una associació negativa entre el càncer de mama i la dieta mediterrània o el consum d'OOVE, sobretot per dones postmenopàusiques i en relació al subtipus ER- ⁴⁶⁻⁴⁸. Tot i així, en una metaanàlisi recent que inclou deu estudis observacionals no ha descrit cap relació significativa entre el consum d'OOVE i el risc de càncer de mama, ressaltant la necessitat de nous estudis prospectius amb millor valoració de l'OOVE. Cal tenir en compte que en molts estudis epidemiològics no es fa distinció entre el consum d'oli d'oliva i l'OOVE, fet que comporta una gran variabilitat en la qualitat i la composició de l'oli consumit ⁴⁸. Per últim, els estudis que relacionen els components de l'OOVE amb el risc de desenvolupar càncer de mama han descrit una relació inversa entre el consum de polifenols o àcid oleic i el risc de patir la malaltia ^{46,49}. En resum, les dades epidemiològiques descriuen que l'evidència més forta de l'associació de la dieta mediterrània, l'OOVE i els seus components i el càncer de mama s'ha observat en els països mediterranis on se segueix aquesta dieta i es consumeix més OOVE.

Introducció

A causa de la gran dificultat per obtenir dades imparcials a partir de variables controlades en humans, la carcinogènesi experimental esdevé una eina indispensable per discernir els mecanismes entre els factors dietètics i la salut. Els estudis clàssics han descrit que les dietes hiperlipídiques exerceixen un clar paper promotor en la carcinogènesi mamària, però per a la mateixa quantitat de greix, és de gran importància el tipus específic de lípids consumits⁵⁰. En general, els PUFA n-6 i els àcids grassos saturats d'origen animal promouen el càncer de mama, mentre que els PUFA n-3 inhibeixen el creixement del tumor i la metastàsis⁵¹. En relació als MUFA, les evidències són encara inconclusives, apuntant a un efecte protector o lleument protector⁵². En general, els estudis s'han realitzat en tumors experimentals de rosegadors induïts químicament per 7,12-dimetilbenz(α)antracè (DMBA) o N-nitrosomemetilurea (NMU) i han descrit un paper especialment promotor per a les dietes riques en greixos PUFA n-6^{53,54}. En aquest sentit, resultats previs del grup en tumors mamaris induïts amb DMBA han mostrat que una dieta rica en PUFA n-6, en comparació amb una dieta baixa en greixos, té un efecte clarament promotor que es manifesta en un alt grau de malignitat clínica i morfològica dels tumors, mentre que una dieta rica en OOVE té un efecte feble, similar al de la dieta control⁵⁵.

Respecte el potencial paper protector de l'OOVE, no només s'ha estudiat l'efecte que exerceixen els lípids que el componen sinó que també s'ha descrit l'efecte dels seu components minoritaris. L'oli d'oliva s'obté del fruit de l'olivera (*Olea europaea* L.) i està format per lípids i un nombre important de compostos minoritaris, alguns d'ells altament bioactius. La fracció principal o fracció saponificable representa més del 98% del pes total de l'oli i està composta principalment per MUFA⁵⁶. La fracció insaponificable té més de 230 components de diferents classes químiques com triterpens, esterols, hidrocarburs, escualè, n-alcans i n-alquens, carotenoides, fenols lipòfils, fenols hidròfils, etc⁵⁷. Molts d'aquests components s'han relacionat amb la prevenció del càncer pels seus efectes antitumorals, especialment hidroxitirosol (HT), secoiridoides, flavonoides, lignans i triterpens⁵³. L'hidroxitirosol i el tirosol són els principals alcohols fenòlics que es troben a l'OOVE i són producte de l'hidròlisi dels secoiridoides. Estudis *in vitro* en diferents línies cel·lulars de càncer de mama han descrit propietats antiproliferatives i proapoptòtiques de l'hidroxitirosol, així com la capacitat d'aturar el cicle cel·lular i inhibir la migració cel·lular i invasió^{58,59}. Estudis

Introducció

experimentals en rates Sprague-Dawley han demostrat la capacitat d'inhibir el creixement i la proliferació cel·lular mitjançant l'alteració de l'expressió de gens involucrats en aquestes vies ⁶⁰. Els secoiridoides són un grup de compostos que es troben a les espècies de plantes oleàcies i que comprenen la majoria de polifenols bioactius de l'oli d'oliva. L'oleuropeïna (OLE) i el seu precursor biosintètic, el ligstroside, són els principals secoiridoides de l'OOVE. Estudis *in vitro* han descrit un efecte inhibidor de la viabilitat cel·lular, el cicle cel·lular, la proliferació i la migració, així com un efecte promotor de l'apoptosi ^{58,61,62}. Resultats similars s'han descrit per l'oleocantal, un derivat de l'OLE ⁵³. Pel que fa al grup dels flavonoides, la luteolina (LUT) també ha demostrat tenir propietats antiproliferatives, proapoptòtiques i inhibidores de la migració i la invasió cel·lular tan en estudis *in vitro* com en estudis *in vivo* ⁶³.

Composició de l'oli d'oliva

Fracció saponificable (>98%)
Triacilglicèrids i derivats
16:0 Àcid palmític
16:1n-7 Àcid palmitoleic
18:0 Àcid esteàric
18:1n-9 Àcid oleic
18:2n-6 Àcid linoleic
18:3n-3 Àcid linolènic
Fracció insaponificable (<2%)
Ésters no glicèrids i ceres
Alcohols alifàtics
Compostos volàtils: aldehids, cetones, alcohols, àcids, esters, etc.
Triterpens: eritrodiol, uvaol, àcid oleanolic i àcid maslínic
Esterols: β -sitoesterol, campesterol, estigmaesterol i avenasterol
Hidrocarburs
Esqualè
N-alcans i n-alquens
Carotenoids: β -carotens i licopens
Pigments: clorofil·les i feofitines
Fenols lipofílics: tocoferols i tocotrienols
Fenols hidrofílics
Àcids fenòlics: àcids gàl·lic, vainílic, cinàmic, cafeic, cumànic i elenòic
Alcohols fenòlics: hidroxitirosol, tirosol i les formes glicosídiques
Secoiridoides: oleuropeïna i derivats del ligstrosid (oleocantal i oleaceïna)
Flavonoides: luteolina i apigenina

Taula 1. Composició de l'oli d'oliva verge extra (OOVE).

Introducció

2.1 Patogènesi del càncer de mama

La carcinogènesi es considera un procés evolutiu en múltiples etapes que reflexa l'acumulació de diferents alteracions cel·lulars que condueixen a la transformació neoplàsica progressiva. Tot i ser una simplificació del procés, els conceptes (provinents de la carcinogènesi en models animals) de iniciació, promoció i progressió són de gran utilitat per entendre la història natural del càncer.

El punt de inici de la transformació neoplàsica correspon a la fase de iniciació, en la que s'acumulen mutacions (espontànies o heretades) amb la participació d'agents endògens i exògens ⁶⁴. A la promoció tumoral, les cèl·lules inicialment transformades poden augmentar el dany genètic i proliferar en resposta a estímuls o promotors (hormones, nutrients, drogues, etc.) que faciliten el creixement i expansió, així com l'aparició de més mutacions. Finalment, a la progressió, l'augment de la proliferació facilita l'aparició de més mutacions i inestabilitat genòmica, i s'adquireix la capacitat de infiltrar teixits i metastatitzar ⁶⁵.

Els lòbuls tipus 1 o TDLU és l'estructura on s'inicia el carcinoma ductal de mama. A part de les evidències en humans, els estudis *in vivo* han demostrat que la transformació neoplàsica es produeix a les cèl·lules epitelials de teixits mamaris rics en lòbuls tipus 1 i 2. En canvi, els lòbuls tipus 3, i més rarament els tipus 4, presenten lesions benignes (fibroadenomes, hiperplàsia, adenomes, etc) ⁴.

A nivell molecular, es coneixen diferents vies patogèniques per les quals el carcinoma esdevé invasor ⁶⁵. Els carcinomes de baix grau i menor malignitat morfològica expressen receptors hormonals, poques alteracions cromosòmiques i absència d'expressió de citoqueratines basals (CK5/6) o de sobreexpressió d'HER2, fet que suggereix que formen part de la via de progressió d'aquests càncers ⁶⁴. Per altra banda, els carcinomes d'alt grau es caracteritzen per mostrar genotips molt complexes, amb guanys i pèrdues de material genètic i amplificacions de gens. Pel que fa a la cèl·lula d'origen, la majoria dels carcinomes deriven de les cèl·lules luminals diferenciades i de les cèl·lules progenitores *stem cells* ⁶⁶.

3. Càncer de mama experimental

Els experiments *in vivo* són essencials per l'estudi de la patologia mamària. Els estudis *in vivo* d'aquest treball s'han realitzat amb un model experimental que utilitza rates Sprague Dawley a les que se'ls hi aplica un carcinogen químic, l'7,12-dimetilbenz(α)antracè (DMBA), capaç de provocar l'aparició de tumors mamaris de característiques molt semblants a les dels tumors humans ⁶⁷. La inducció tumoral es realitza mitjançant l'administració del carcinogen DMBA per instil·lació bucogàstrica. L'ús de DMBA com a carcinogen respecte altres carcinògens químics presenta algunes avantatges, ja que, produeix efectes extratumorals moderats (sempre que la dosi no sigui superior a 20mg DMBA/animal), la mortalitat postinducció és pràcticament nul·la i té un alt rendiment en la promoció específica de tumors mamaris amb característiques semblants a les dels tumors humans ⁶⁸.

El DMBA és un compost lipòfil que requereix d'activació metabòlica per actuar com a carcinogen ⁶⁹. Els hidrocarburs aromàtics com el DMBA s'activen principalment pels enzims citocrom P450 de la família classe 1 (CYP1). Els metabòlits carcinogènics que resulten de l'oxidació del DMBA poden interactuar amb macromolècules, particularment àcids nucleics i proteïnes ⁷⁰. S'han descrit diferents vies de metabolització del DMBA que donen com a resultat metabòlits que poden unir-se a l'ADN formant adductes, complexos que poden estabilitzar-se i romandre a l'ADN si no són reparats per als mecanismes de reparació per escissió de nucleòtids (NER). D'altra banda, aquests adductes poden alliberar-se de l'ADN produint el trencament entre una base purínica i la desoxiribosa ⁷¹. Si aquests adductes no són eliminats ni es repara l'ADN, es converteixen en lesions premutagèniques que precedeixen la iniciació tumoral ⁶⁸. Per últim, els mateixos metabòlits generats de l'oxidació del DMBA poden generar danys oxidatius a les molècules cel·lulars i activar vies de senyalització cel·lular⁶⁷.

Els factors crítics del model experimental de càncer de mama induït amb DMBA són: 1) l'espècie animal receptora, 2) la dosi de carcinogen i 3) el moment de l'administració per instil·lació gàstrica. Respecte a l'espècie seleccionada, la rata és l'animal que millor s'ajusta a les necessitats del model perquè compleix les condicions mínimes de similitud perquè els resultats obtinguts siguin útils per abordar el problema en humans,

Introducció

facilita l'assaig perquè és practicable i fàcil de manipular, els tumors desenvolupats són homonodependents, són de la mateixa classe anatomopatològica que els tumors humans, presenta una incidència de tumors molt baixa fins als vuit mesos, els tumors espontanis més freqüents són fibroadenomes benignes i per últim, el temps de latència de la inducció tumoral és breu (20-40 dies) ⁶⁷. En relació a la dosi del carcinogen, s'ha descrit una relació estequiomètrica entre la dosi i els paràmetres de la inducció (incidència, mitjana tumoral, etc) i entre la dosi i els efectes tòxics del DMBA. Una dosi de 20 mg DMBA/animal és òptima per l'assaig d'agents inhibidors, i una dosi de 2,5 a 5 mg DMBA/animal per l'estudi d'agents promotors. Més de 20 mg DMBA/animal no milloren l'eficàcia del mètode i, en canvi, augmenten la mortalitat postinducció i els efectes extratumorals del carcinogen. L'administració oral del carcinogen mitjançant instil·lació gàstrica és la més efectiva i còmoda ⁶⁷. El moment de la inducció del tumor és clau. La susceptibilitat de la glàndula mamària de la rata als carcinògens químics depèn de l'estat en el que es trobi l'animal. En general, la inducció amb DMBA es realitza entre els dies 50-55 d'edat, poc després de l'edat mitjana de la pubertat. Aquesta edat coincideix amb l'època de major síntesi de l'ADN a la glàndula mamària ⁷². És important tenir en compte l'historial reproductiu dels animals perquè la taxa de proliferació és diferent en una glàndula d'una rata nul·lípara o múltipara. Les rates nul·líparaes tenen una glàndula mamària amb un alt contingut de TEBs amb una elevada capacitat proliferativa, major captació de metabòlits reactius del DMBA i formació d'epòxids. A més, tenen una capacitat menor d'eliminar adductes, ja que, la fase G1 del cicle és menor. En canvi, en estructures més diferenciades, com les estructures lobulars que predominen en la glàndula mamària dels animals gestants, es caracteritzen per tenir una baixa activitat sintètica de l'ADN, baix índex mitòtic, baixa captació de carcinogen i major capacitat per reparar els danys a l'ADN ⁷³. El DMBA indueix en aquests animals la formació d'estructures transformades que en lloc de diferenciar-se a AB o involucionar a TD, creixen en proliferar les cèl·lules epitelials luminals, formant les proliferacions intraductals (PIDL). Algunes d'aquestes formacions progressaran formant microtumors (carcinomes intraductals) i posteriorment, a carcinomes invasius. Alguns TEBs presents a la glàndula mamària en el moment de la inducció es diferencien a AB però el seu número sempre és menor que en animals no induïts ⁶⁷. Els TEBs que ja s'havien convertit en estructures més diferenciades (ABs i

Introducció

estructures lobulars primerenques) abans de l'administració del carcinogen, no desenvolupen símptomes. El fet que els carcinomes mamaris experimentals sorgeixen d'estructures no diferenciades (TEB i TD) i que les lesions benignes evolucionen d'estructures més diferenciades, indicaria que el carcinogen necessita una diana estructural adequada i que la classe de lesió induïda és dependent de l'àrea de la glàndula mamària afectada. Aquest fet explica la major incidència de tumors localitzats en les glàndules de la regió toràcica, que són les que contenen major quantitat de TEBs⁹.

4. Lípids de la dieta i càncer de mama: mecanismes

Com s'ha comentat, s'ha descrit una possible relació entre els lípids de la dieta i la seva influència en el desenvolupament del càncer, que depèn de la quantitat i del tipus de lípid consumit, però encara no es coneixen del tot els mecanismes i probablement, *in vivo* actuen de manera simultània i integral.

D'una banda, els lípids poden modificar a nivell sistèmic diferents paràmetres que incideixen en el desenvolupament tumoral (nivells d'hormones, activitat del sistema immunitari, estrès oxidatiu). D'altra banda, poden induir modificacions moleculars en els tumors a diferents nivells: membrana plasmàtica, senyalització intracel·lular o expressió gènica⁷⁴.

4.1 Estat hormonal, creixement i maduració sexual

Nombroses evidències epidemiològiques suggereixen que diversos aspectes relacionats amb el creixement i la maduració sexual són un factor de risc del càncer de mama. La nul·liparitat o un primer embaràs en edat avançada són factors de risc, i s'han relacionat amb l'estat de màxima diferenciació de la glàndula mamària, que en aquests casos o bé no s'assoliria o ho faria molt tard¹³. També són factors de risc l'avançament de la pubertat i la menopausa tardana, ja que, augmenten el nombre de cicles reproductors, i en el primer cas a més la glàndula estaria exposada a la proliferació primerenca per exposició a estrògens⁷⁵. La pubertat està influïda per factors hormonals, nutricionals i energètics. El desenvolupament puberal es produeix com a conseqüència de l'activació i maduració de l'eix hormonal hipotàlem-hipòfiso-gonadal.

Introducció

La naturalesa cíclica de les hormones i els seus nivells làbils dificulten establir una relació amb el desenvolupament del càncer de mama i els lípids de la dieta, per la qual cosa les dades sobre els nivells hormonals per efecte dels greixos no són concloents i s'han fet pocs estudis amb l'oli d'oliva. En rates embarassades, una dieta amb OOVE del 7% va reduir els nivells d'estradiol en comparació amb una dieta amb oli de blat de moro i amb dietes hiperlipídiques ⁵⁴. Tanmateix, en resultats previs del grup es va observar que l'administració d'una dieta d'EVOO al 20% a partir del deslletament no va induir canvis en les hormones (LH, FSH, estradiol, progesterona, prolactina, insulina i corticosterona) ni en els receptors hormonals de la glàndula mamària ni en els tumors però sí que va augmentar el receptor de progesterona a les glàndules mamàries a les edats properes a la pubertat ⁷⁶.

Altrament, s'ha descrit que una dieta rica en greixos pot produir l'avançament de la pubertat, fet que incrementa el temps d'exposició a estrògens i es relaciona amb un factor de major risc de càncer de mama ⁷⁷.

La relació entre l'obesitat i el risc de desenvolupar càncer de mama depèn, entre d'altres factors, de l'estat hormonal. S'ha descrit que l'obesitat augmenta el risc de desenvolupar la neoplàsia en dones postmenopàusiques però, en canvi, sembla tenir un paper protector en dones premenopàusiques ⁷⁸. En dones postmenopàusiques obeses el teixit adipós es converteix en una font de síntesi d'estrògens en un moment vital on fisiològicament els nivells es troben disminuïts ²⁷. A més, l'obesitat genera un estat general d'inflamació que també s'associa a la síntesi de citoquines que poden participar en el desenvolupament i a la progressió de la malaltia ⁷⁹. Pel que fa a la tendència observada en dones premenopàusiques, encara no es coneixen els mecanismes pels quals s'estableix aquesta relació. Alguns estudis hipotetitzen que el paper protector de l'obesitat en aquest grup de dones podria ser pels nivells d'estrògens, juntament amb els d'adiponectina, ja que, presenten nivells elevats d'adiponectina i baixos de leptina. Pel contrari, dones malaltes de la mateixa condició presenten nivells elevats de leptina i baixos d'adiponectina ⁷⁸.

La leptina és produïda principalment al teixit adipós i, en menor mesura, a la glàndula mamària, ovaris, estómac i placenta. Els seus nivells correlacionen de forma directa amb el pes i el greix corporal i també es troba involucrada en la regulació del eix

Introducció

reproductiu⁸⁰. S'ha descrit la presència de receptors per a aquesta hormona en tumors de càncer de mama, entre d'altres, i se li ha atribuït una funció estimuladora de la proliferació⁸¹. En canvi, l'adiponectina es correlaciona negativament amb el pes corporal i s'associa positivament amb un menor risc de càncer de mama. Per altra banda, s'ha observat que nivells baixos d'aquesta hormona s'associen a tumors més malignes. Es creu que el seu mecanisme d'acció podria ser a través de mecanismes indirectes que inhibeixen la proliferació i activen l'apoptosi⁸². Estudis epidemiològics i experimentals han descrit que una dieta rica en greixos PUFA n-3 augmenten els nivells d'adiponectina en individus sans i en canvi, una dieta rica en greixos saturats els disminueix⁸³.

4.2 Sistema immunitari

Durant el desenvolupament tumoral es produeixen canvis en el sistema immunitari^{84,85}. L'activació dels mecanismes inflamatoris desencadena l'estimulació de factors de transcripció a les cèl·lules tumorals, com per exemple STAT3 (transductor de senyal i activador de la transcripció 3) o NFκB, que al seu temps coordinen la producció de mediadors inflamatoris. Tot això genera un microambient tumoral inflamatori que facilita el reclutament i l'activació de macròfags, mastòcits, eosinòfils i neutròfils⁸⁵.

Els lípids de la dieta també tenen efectes en la resposta immune i la producció de citoquines inflamatòries. En general, els PUFA n-6 són substrats per a la síntesi de metabòlits proinflamatoris i en canvi, els PUFA n-3 ho són per metabòlits amb efectes antiinflamatoris^{74 86}. En aquest sentit, s'ha demostrat que la prostaglandina PGE2, sintetitzada a partir de l'àcid araquidònic (AA), suprimeix la resposta immunitària⁸⁷.

Alguns estudis que relacionen el consum d'OOVE amb el sistema immunitari indiquen que l'OOVE podria modificar la producció de citoquines inflamatòries i ser un mediador de la resposta immune. De fet, hi ha estudis que relacionen la dieta mediterrània amb una incidència menor de certes patologies relacionades amb la inflamació crònica i el sistema immunitari i alguns d'aquests efectes s'atribueixen a la font principal de greixos d'aquesta dieta, l'OOVE⁸⁸. En aquest sentit s'ha demostrat que l'àcid oleic té efectes antiinflamatoris. En estudis amb rates s'ha observat que la ingesta materna de una dieta amb un 15% d'OOVE té un efecte inhibidor del càncer de colon en la

Introducció

descendència, augmentant el número total de cèl·lules limfàtiques i limfòcits CD8(+) en els tumors ⁸⁹. A més, s'ha observat que alguns polifenols de l'OVOE poden inhibir la producció d'eicosanoids i citoquines inflammatòries tan *in vitro* com *in vivo* ^{90,91}.

4.3 Modificacions de la membrana cel·lular

La membrana plasmàtica és una bicapa lipídica formada per fosfolípids, colesterol i proteïnes que contenen uns microdominis anomenats bales lipídiques o, en anglès, *lipid rafts*. La composició lipídica i el contingut de colesterol de les membranes està regulat per les cèl·lules i poden variar en funció dels lípids de la dieta ⁹². Els nivells d'àcids grassos saturats i monoinsaturats es mantenen relativament constants dins d'un ampli rang de variació de la dieta. En canvi, la composició de la membrana és més sensible als nivells de PUFA n-6, als PUFA n-3 i a la proporció entre ells ⁸⁶.

Pel que fa a la composició de la membrana lipídica en les cèl·lules tumorals, Rysman *et al.* van analitzar els extractes cel·lulars mitjançant espectrometria de masses i van observar les diferències entre les membranes cel·lulars provinent de teixits tumorals i de teixits sans. En els teixits tumorals, els lípids que formen les membranes provenen en gran part de la síntesi *de novo* i per tant, predominen els àcids grassos saturats (SFA) i els MUFA. Aquest canvi en la composició protegeix a les membranes cel·lulars de la peroxidació lipídica, ja que, els SFA són menys propensos a la peroxidació en comparació amb els PUFA ⁹³. A més, els SFA redueixen la fluïdesa de la membrana i això pot alterar les vies de senyalització cel·lular ⁹⁴. Per tant, els canvis en la composició lipídica de les membranes cel·lulars poden modificar el comportament cel·lular canviant la fluïdesa de la membrana, afectant les vies de transducció de senyal i modificant el grau de peroxidació lipídica de les membranes ⁹⁵.

Estudis més clàssics ja havien descrit la capacitat d'alterar la composició lipídica de les membranes cel·lulars dels tumors per part de la dieta ^{96,97}. Recentment, un treball en tumors experimentals, ha descrit que els canvis en la composició lipídica dels fosfolípids de membrana depenen directament de la dieta subministrada i es relacionen amb alguns paràmetres de malignitat. Concretament, els tumors dels animals alimentats amb una dieta que contenia un 10% d'oli d'oliva, presentaven els nivells més elevats d'àcid oleic i més disminuïts d'àcid linoleic en les membranes cel·lulars. A més, es van observar temps de latència majors i volum tumoral menors en

Introducció

comparació amb els animals alimentats amb una dieta que contenia un 10% de PUFA n-6 ⁵².

Les modificacions de la composició lipídica de la membrana cel·lular també afecten l'organització dels *lipid rafts* ⁹⁸. Aquestes bales lipídiques són dominis petits (10-200nm) i representen el 10-15% de l'àrea de la membrana plasmàtica. Es caracteritzen per tenir una composició rica en colesterol, esfingolípids i àcids grassos saturats. Es coneixen dues varietats de microdominis en la superfície cel·lular; les caveoles i els dominis G. Les primeres, participen en la senyalització cel·lular, l'endocitosi o el tràfic de colesterol ⁹⁹. Els dominis G, en canvi, es caracteritzen per tenir la capacitat de reclutar o excloure proteïnes involucrades en les vies de senyalització, regulant així aquestes vies ¹⁰⁰. S'ha descrit que els PUFA poden alterar el funcionament cel·lular modificant el contingut de colesterol, l'activitat dels receptors o les vies de senyalització ⁴⁴. A més, s'ha observat que dietes riques en PUFA n-6 incrementen la proliferació tumoral. En canvi, pel que fa als PUFA n-3, s'ha descrit un efecte protector, associat amb diferents mecanismes com que competeixen per a la incorporació dels àcids grassos a la membrana, participen en la transducció de senyals promovent apoptosi i diferenciació cel·lular, competeixen per l'enzim limitant en la via de síntesi dels eicosanoides, alteren l'estat oxidatiu de la cèl·lula promovent la peroxidació lipídica i alterant la formació de les bales lipídiques ⁴⁴.

La susceptibilitat a la peroxidació lipídica es determina segons el grau d'insaturacions dels àcids grassos que formen els fosfolípids de la membrana. Un grau d'insaturació alt es relaciona amb un augment de l'estrès oxidatiu i modifica les vies de senyalització fisiològiques facilitant la transformació maligna ⁷⁴. En un estudi *in vivo* amb rates alimentades amb diferents olis d'origen vegetal rics en PUFAs es va observar una relació directa entre el contingut de PUFAs i els nivells de peroxidació de les membranes cel·lulars. A més, també es va veure que l'increment en la peroxidació lipídica anava acompanyat d'una disminució de l'activitat dels enzims antioxidants. Els metabòlits resultants de la peroxidació poden inactivar enzims i receptors de membrana i canviar-ne les propietats ¹⁰¹.

Introducció

4.4 Efectes en la transducció de senyals

Els canvis en la composició de la membrana poden alterar la transducció de senyals. Les diferents fosfolipases cel·lulars poden generar molècules bioactives que actuen com a segons missatgers o com a moduladors de vies de senyalització. Alguns d'aquests metabòlits generats són l'inositol-trifosfat (IP₃), diacilglicerol (DAG) i àcids grassos lliures (*free fatty acids*, FFA) que participen en l'activació de vies de senyalització com la via de les MAPK ⁹⁹. Per tant, els canvis en la composició de la membrana cel·lular per part dels lípids de la dieta poden modificar els missatgers secundaris i les vies de senyalització cel·lulars. Un exemple són els eicosanoides sintetitzats a partir dels àcids grassos lliures alliberats dels fosfolípids de la membrana. Es poden diferenciar dues famílies d'eicosanoides amb diferents efectes; els derivats de l'àcid linoleic (n-6) via l'àcid araquidònic (AA), i els derivats de l'àcid linolènic (n-3) via l'àcid eicosapentanoid (EPA) ⁹⁵. Les dietes riques en PUFA n-3 promouran la síntesi d'eicosanoides derivats de l'àcid linolènic i als que se'ls hi atribueix una resposta antiinflamatòria. En canvi, les dietes riques en PUFA n-6 promouran la síntesi dels derivats de l'AA com per exemple, la PGE2 que promou la proliferació cel·lular i inhibeix l'apoptosi, entre d'altres ⁸⁷. En aquest sentit, l'efecte promotor de les dietes hiperlipídiques en el càncer s'ha relacionat amb una producció major de prostaglandines. En relació amb els PUFA n-3 i l'àcid oleic (MUFA), s'ha postulat que el seu efecte protector es deu a la competició amb els PUFA n-6 pels enzims de síntesi de prostaglandines ¹⁰². A més, en el cas de l'OOVE, s'ha observat que els components minoritaris com l'hidroxitirosol o l'oleuropeïna poden inhibir la inflamació produïda per la PGE2 ⁸⁸.

Com s'ha comentat anteriorment, els canvis en la composició de la membrana també inclouen canvis en els *lipid rafts* i la fluïdesa de la membrana, i també poden alterar les vies de transducció. En aquest sentit, s'ha descrit que els PUFA n-3 generen membranes més gruixudes i amb un ambient més insaturat que quan són riques en PUFA n-6 i això dificulta la interacció d'algunes proteïnes ¹⁰³. Per exemple, l'afinitat de la proteïna K-Ras, una GTPasa implicada en processos carcinogènics, es veu afectada per la composició dels fosfolípids de la membrana cel·lular. Les diferències en l'afinitat entre la proteïna i la membrana afecta l'orientació del centre catalític de l'enzim i, per tant, les interaccions amb les proteïnes reguladores i efectores es veuen també

Introducció

alterades. En resum, la forma en què un enzim interacciona amb la membrana cel·lular pot alterar la seva funció en la senyalització intracel·lular ⁹².

4.5 Efectes en l'expressió gènica

Els canvis en el perfil d'expressió gènica modulen diferents processos moleculars i els factors dietètics poden influir-hi per un efecte directe o a conseqüència de la interacció d'altres mecanismes, com per exemple canvis en la membrana cel·lular, l'activació de certes vies de senyalització o canvis en l'epigenètica ¹⁰⁴. Els àcids grassos o els seus metabòlits controlen l'activitat d'alguns factors de transcripció mitjançant la unió i activació de diversos receptors nuclears, entre ells els receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR), el receptor X hepàtic (LXR) i les famílies de receptors de l'àcid retinoic (RxR i RAR) ⁹⁹. A més, poden actuar de forma directa alterant l'activitat o l'abundància nuclear dels factors de transcripció sense la necessitat d'unir-s'hi, com per exemple, NF- κ B ("Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"), SREBP ("sterol-regulatory element-binding protein"), c/EBP β (CCAAT/"enhancer-binding protein B") i HIF-1 α ("hypoxia-inducible factor-1 α ")^{99,105}. S'ha descrit que una dieta rica en greixos modula l'expressió del metabolisme lipídic en diferents teixits per mantenir l'homeòstasi. Per exemple, estudis experimentals han demostrat que una dieta suplementada amb MUFA modula l'expressió i l'activitat de PPAR α i SREBP1 en fetge i teixit adipós ¹⁰⁶. Aquests factors de transcripció regulen l'expressió de diferents gens involucrats en el metabolisme; PPAR α controla l'expressió de gens involucrats en la β -oxidació com la carnitina-palmitoil transferasa (cpt1 i 2), la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) o el transportador d'àcids grassos CD36. La sobreexpressió d'aquest transportador es relaciona amb un mal pronòstic de la malaltia, possiblement per la predisposició d'aquests tumors que l'expressen en acumular i metabolitzar els lípids necessaris per als processos de metàstasi. SREBP1 modula l'expressió de gens involucrats en la síntesi d'àcids grassos i colesterol com per exemple, FASN. La sobreexpressió d'aquest enzim també s'associa amb mal pronòstic del càncer de mama ¹⁰⁷. Estudis en rosegadors han demostrat que una dieta hiperlipídica provoca canvis en la programació genètica durant el desenvolupament de la glàndula mamària augmentant la susceptibilitat a desenvolupar càncer de mama. Concretament, en un estudi es va descriure que la dieta hiperlipídica rica en PUFA durant el desenvolupament de la glàndula mamària va

Introducció

provocar un augment de les característiques basals i una pèrdua de l'expressió gènica de característiques luminals, fet que suggereix una reprogramació genètica que afavoreix el desenvolupament de càncer de mama del tipus basal ¹⁰⁸. Pel que fa a l'efecte de l'OOVE i l'expressió gènica en càncer de mama, estudis previs del grup van descriure que una dieta amb un 20% d'OOVE induïa canvis a la glàndula mamària i als tumors. En el cas de la glàndula mamària, es va observar que una dieta rica en oli de blat de moro disminuïa l'expressió de gens relacionats amb el sistema immunitari i l'apoptosi, mentre que la dieta alta en OOVE modificava principalment gens relacionats amb el metabolisme. En els tumors induïts per DMBA, l'efecte de les dietes va ser similar als descrits a la glàndula mamària ¹⁰⁹. Un altre estudi on va estudiar l'exposició prenatal a diferents dietes riques en greixos, també va demostrar canvis en la susceptibilitat de desenvolupar la neoplàsia així com canvis en el perfil transcriptòmic de la glàndula mamària ⁵³.

L'epigenètica és el conjunt de modificacions dinàmiques i heretables del genoma que es produeixen independentment de la seqüència d'ADN. Les modificacions dels patrons epigenètics, inclosa la hipometilació global de l'ADN, la hipermetilació del promotor de gens supressor de tumors i les modificacions d'histones, s'han considerat com a característiques distintives del càncer ^{110,111}. Estudis previs del grup van revelar diferents mecanismes d'acció de les dietes hiperlipídiques (rica en oli de blat de moro vs. rica en OOVE) sobre els patrons epigenètics, que es podrien relacionar amb l'efecte promotor del tumor descrit per l'oli de blat de moro i un efecte lleugerament protector per part de l'OOVE. En aquest cas, la dieta rica en OOVE va disminuir els nivells d'hipometilació global de l'ADN i va canviar els patrons de modificació de les histones¹¹².

4.6 Efectes en l'estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu és un fenomen causat per un desequilibri entre la producció i acumulació d'espècies reactives a l'oxigen (ROS) a les cèl·lules i teixits i la capacitat que tenen per desintoxicar aquests productes reactius. Les ROS exerceixen diferents funcions segons la concentració a la qual es troben. Nivells moderats poden promoure la tumorigènesi, el desenvolupament i la metastasi del càncer activant o regulant diferents vies de senyalització involucrades en la supervivència, proliferació i

Introducció

metàstasi^{113,114}. En canvi, nivells elevats s'han relacionat amb efectes supressors de tumors per la inhibició de la proliferació cel·lular i la inducció de l'apoptosi ¹¹⁵. En aquest sentit, molts dels tractaments del càncer com la radioteràpia i alguns agents quimioterapèutics actuen augmentant la producció de ROS per suprimir el creixement i la progressió tumoral ¹¹⁶. Les cèl·lules tumorals aconsegueixen neutralitzar ROS activant mecanismes antioxidants per prevenir l'apoptosi causada pels alts nivells ¹¹⁷.

ROS pot generar danys oxidatius a l'ADN, pot danyar el reservori cel·lular i mitocondrial de bases nitrogenades i/o afectar l'activitat de proteïnes involucrades en la reparació de l'ADN ¹¹⁸. A més, també pot reaccionar amb els lípids de les membranes cel·lulars, sobretot els PUFA i generar productes resultants de la peroxidació lipídica que poden interaccionar amb l'ADN i bloquejar-ne la transcripció i replicació ¹¹⁹. Diferents càncers, inclòs el càncer de mama, mostren alteracions en els enzims antioxidants com la superòxid-dismutasa (SOD), la catalasa glutatió peroxidasa (GPx), i en antioxidants no enzimàtics com el glutatió (GSH), la vitamina C, tioredoxina (TRx) ^{120,121}. En general, s'ha descrit una disminució de la capacitat antioxidant de les cèl·lules tumorals respecte teixits sans, fet que afavoreix la formació de lesions a l'ADN i permet l'adquisició d'un fenotip tumoral més agressiu ¹²².

Els factors nutricionals poden influenciar la carcinogènesi a través de la modulació de l'estrès oxidatiu i la peroxidació lipídica. De fet, l'estat redox de les cèl·lules pot ser modificat per la dieta, vist que la majoria dels antioxidants no enzimàtics s'adquireixen a través d'ella, com per exemple, la vitamina C i E o els polifenols ^{123,124}. Amb relació a l'OOVE, diferents estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat la capacitat antioxidant i els beneficis que comporta el seu consum. S'ha descrit que l'OOVE disminueix la proliferació de les línies cel·lulars de leucèmia, aturant el cycle cel·lular i augmentant l'apoptosi ¹²⁵. A més, en un estudi *in vivo*, l'administració d'OOVE a rates exposades a estrès oxidatiu va revelar una disminució de la peroxidació lipídica de les membranes dels eritròcits a causa de l'alt contingut de MUFA d'aquestes membranes ¹²⁶. Malgrat la protecció contra la peroxidació lipídica que pot conferir l'alt contingut en MUFAs de l'OOVE, alguns dels efectes antioxidants s'han atribuït als components minoritaris. Estudis *in vitro* amb extractes de polifenols han demostrat reduir els nivells de ROS, la peroxidació lipídica i la sobreproducció d'òxid nítric mitjançant la modulació dels nivells

Introducció

de proteïnes involucrades en aquestes vies ¹²⁷. Al contrari, s'ha descrit que una dieta rica en PUFA n-6 augmenta l'estrès oxidatiu i disminueix la capacitat antioxidant cel·lular ¹²⁸.

5. *Hallmarks* del càncer de mama

5.1 Apoptosi

L'apoptosi és una forma de mort cel·lular programada i la seva desregulació s'associa amb diferents malalties. En el cas del càncer, és una via cel·lular que es troba disminuïda o desactivada obtenint així un avantatge de supervivència. Les cèl·lules tumorals acostumen a evadir l'apoptosi mitjançant la sobreexpressió o estabilitzant les proteïnes antiapoptòtiques mentre inhibeixen transcripcionalment o posttranscripcionalment les proteïnes proapoptòtiques ¹²⁹. A més, també inactiven els factors de transcripció que desencadenen l'apoptosi, com per exemple el supressor de tumors p53, que també participa en altres funcions cel·lulars com en la regulació del metabolisme. Per tant, la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals també participa en la regulació de l'apoptosi ¹³⁰.

Els mecanismes de l'apoptosi són complexes i impliquen una cascada d'esdeveniments moleculars regulats. Les vies més estudiades de regulació de l'apoptosi són la via extrínseca i la intrínseca ¹²⁹ però s'han descrit altres com l'associada a l'estrès de reticle endoplasmàtic o la caspasa-independent. Breument, la via d'apoptosi extrínseca s'inicia mitjançant la unió de lligands de mort als seus receptors situats a la membrana plasmàtica. La via intrínseca s'activa en resposta a l'estrès intracel·lular, com per exemple, el dany a l'ADN i l'estrès metabòlic. Malgrat que la seva iniciació sigui per factors diferents, ambdues vies activen les caspases efectores i convergeixen en l'activació de la caspasa-3 ¹³⁰.

Introducció

Les cèl·lules tumorals evadeixen l'apoptosi i utilitzen diferents mecanismes per aconseguir-ho que es poden classificar en mecanismes que preveuen la permeabilització de la membrana mitocondrial o mecanismes que inhibeixen la funció de les caspases. Per exemple, per evitar danys en la membrana mitocondrial, les cèl·lules tumorals sobreexpressen la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 o pateixen la pèrdua de funció del supressor de tumors p53, que indueix l'apoptosi mitjançant la sobreexpressió de proteïnes proapoptòtiques com PUMA. També s'ha observat en alguns càncers la pèrdua o silenciament dels gens que codifiquen per les proteïnes Bax, Bak, PUMA o NOXA. Malgrat que la permeabilització de la membrana mitocondrial i l'obertura dels canals es considera un punt de no retorn, s'ha vist que les cèl·lules tumorals poden sobreviure en aquestes condicions mitjançant la inhibició de les caspases i mantenint un cert nivell de funció mitocondrial ¹³¹.

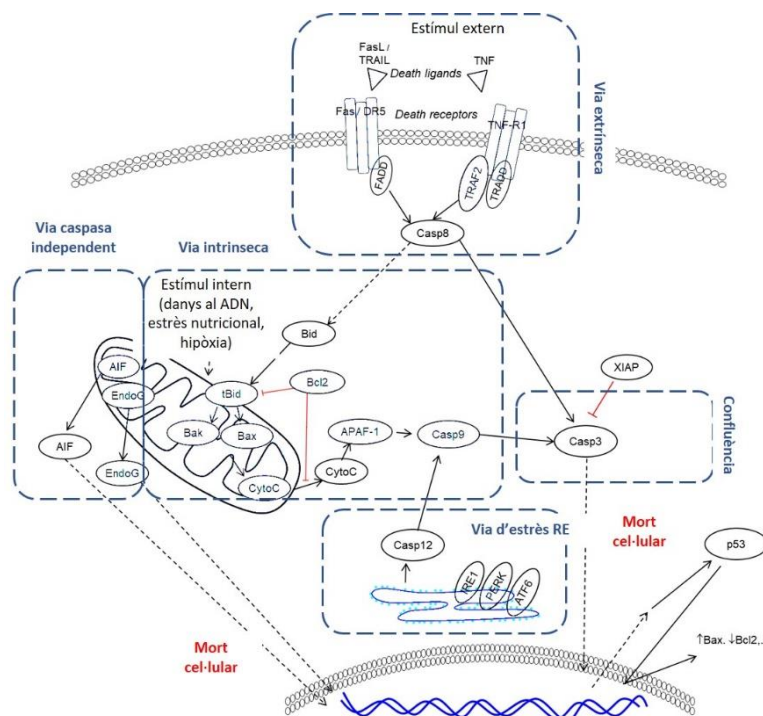


Figura 5. Vies de senyalització apoptòtiques; via extrínseca, via intrínseca, via caspasa independent, via d'estrès del RE i el punt de confluència.

5.1.1 Caspases

Les caspases són proteases i participen en la cascada de senyalització de l'apoptosi. Es poden classificar en dos grups segons la seva acció; les iniciadores i les efectores ¹²⁹.

Introducció

Ambdues tenen una unitat catalítica formada per una subunitat gran i una petita, però les caspases iniciadores necessiten una proteïna adaptadora específica per a la seva activació, mentre que les caspases efectores són activades directament per les iniciadores. Dins del grup de les caspases iniciadores hi trobem la caspasa-2, -8, -9 i -10, i dins del grup de les efectores hi trobem la caspasa-6, -7 i -3. Un cop les caspases efectores són activades, proteolitzen un seguit de substrats proteics i inicien l'apoptosi, donant lloc a la posterior destrucció dels components cel·lulars ¹³².

5.1.2 Via extrínseca

L'activació de la via extrínseca és regulada mitjançant receptors de mort transmembrana situats a la membrana plasmàtica. Aquests receptors són membres de la superfamília de gens del receptor del factor de necrosi tumoral (TNF) i tots tenen un domini extracel·lular ric en cisteïnes i un domini citoplasmàtic anomenat "domini de la mort". Aquest domini intracel·lular té un paper crític en la transmissió del senyal de mort des de la superfície cel·lular a les vies de senyalització intracel·lular ¹²⁹. La cascada de senyalització comença amb la unió de lligand al seu receptor corresponent, com per exemple TNF- α al receptor TNFR1, o Fas lligand (Fas-L) al receptor Fas (Fas-R) ¹³³. En ambdós casos, la unió del lligand amb el receptor provoca l'activació del domini de mort intracel·lular que promou el reclutament de proteïnes citoplasmàtiques. Així l'activació de TNFR1 provoca la unió de la proteïna del domini de mort associada (TRADD), mentre que l'activació de Fas-R permet la unió de la proteïna associada al domini de mort de Fas (FADD). La procaspasa-8 o la procaspasa-10 poden unir-se ara als receptors activats amb les seves proteïnes adaptadores i formar el complex de senyalització que indueix la mort (DISC). Aquest complex DISC permet l'activació de la caspasa-8 o -10 i l'inici de la cascada de senyalització donant lloc a l'actuació de les caspases efectores ^{129,132}.

5.1.3 Via intrínseca

L'activació de l'apoptosi per la via intrínseca implica una varietat d'estímuls no intervinguts per receptors que produeixen senyals intracel·lulars iniciats en els mitocondris que desencadenen la resposta de mort cel·lular. Els estímuls involucrats inclouen la falta de factors de creixement, hormones o citocines, la hipòxia i l'estrès oxidatiu ¹²⁹. Tots aquests estímuls provoquen canvis en la membrana mitocondrial

Introducció

interna causant l'obertura dels porus de transició de permeabilitat mitocondrial (MPT), pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i l'alliberació al citosol de proteïnes proapoptòtiques que es troben al mitocondri, com per exemple el citocrom c o smac/diablo ¹³⁴. La sortida del citocrom c al citosol es considera el principal esdeveniment activador de la via intrínseca. Un cop alliberat al citosol, pot interactuar amb el factor activador de la proteasa apoptòtica 1 (APAF-1) i juntament amb la procaspasa-9 formen l'apoptosoma, que permet l'activació de la caspasa-9. Quan smac/diablo surt al citosol pot inhibir la proteïna inhibidora de l'apoptosi (IAP), una proteïna encarregada d'evitar l'activació de la caspasa-9 en absència de mort cel·lular. Altres proteïnes com AIF o l'endonucleasa G són alliberades del mitocondri posteriorment, quan l'apoptosi ja està activada i la mort cel·lular és una realitat. Ambdues proteïnes transloquen al nucli i afavoreixen la degradació de l'ADN i la condensació de la cromatina ¹³¹.

Aquests esdeveniments mitocondrials són regulats a través de proteïnes de la família Bcl-2, que al mateix temps es troben regulades pel supressor de tumor p53. Dins de la família de proteïnes Bcl-2 es troben proteïnes proapoptòtiques com Bax, Bak, Bid, Bad o Bik, i antiapoptòtiques com Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, PUMA o NOXA. El balanç global de l'expressió d'aquestes proteïnes és el que regula si la cèl·lula entra en apoptosi o no. El principal mecanisme d'acció per modular l'inici de l'apoptosi és la regulació de la sortida del citocrom c de la membrana mitocondrial mitjançant l'alteració de la permeabilitat d'aquesta membrana ¹³⁵.

5.1.4 Altres vies apoptòtiques

Una tercera via d'activació de l'apoptosi depenent de caspases és la relacionada amb l'estrès del reticle endoplasmàtic ¹³⁶. Malgrat no ser una via tan estudiada com les comentades anteriorment, s'ha descrit que és regulada per la caspasa-12 i independent dels esdeveniments mitocondrials ¹³⁷. En situacions d'estrès del reticle, com per exemple hipòxia, presència de radicals lliures o inanició de glucosa, es produeix l'acumulació de proteïnes sense plegar i es disminueix la síntesi de proteïnes. Una conseqüència d'aquest estrès és l'alliberació i l'activació de la procaspasa-12 que normalment es troba ancorada a la membrana del reticle a través de la unió amb el

Introducció

factor 2 associat al receptor de TNF (TRAF2). La caspasa-12 activada pot activar la caspasa-9, punt de convergència amb la via intrínseca ¹³⁸.

S'ha descrit que factors mitocondrials com AIF i l'endonucleasa G poden ser alliberats en situacions de dany mitocondrial i activar l'apoptosi independent a caspases ¹³⁹.

5.1.5 Execució de l'apoptosi

La via extrínseca i la intrínseca convergeixen en la fase final de l'apoptosi, la fase executora, que comença amb l'activació de la caspasa-3, -6 i -7 ¹²⁹. Un cop activades, promouen l'acció de les endonucleases citoplasmàtiques que degradaran l'ADN i les proteïnes del citoesquelet. La caspasa-3 és considerada la caspasa executora més important perquè és on convergeixen les dues vies d'activació de l'apoptosi i, per tant, pot ser activada per qualsevol de les caspases iniciadores (caspasa-8, -9 o -10) ¹³².

L'última fase de l'apoptosi és la fagocitosis de les cèl·lules. L'externalització de la fosfatidilserina, un fosfolípid característic de la part intracel·lular de la membrana plasmàtica, és l'iniciador d'aquesta fase. L'aparició de la fosfatidilserina a la part externa de la membrana plasmàtica facilita la resposta fagocítica i no inflamatòria. Aquest procés és intervingut per les caspases activades durant l'apoptosi, que proteolitzen les flipasses encarregades de mantenir l'homeòstasi de la membrana cel·lular ¹⁴⁰.

5.1.6 Regulació metabòlica de l'apoptosi

Com s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules tumorals desenvolupen mecanismes d'evasió de l'apoptosi i, alguns d'aquests mecanismes es relacionen amb el metabolisme cel·lular ¹³⁰.

El metabolisme de la glucosa en les cèl·lules tumorals és un dels mecanismes principals per a l'evasió de l'apoptosi. Moltes de les molècules que participen en la regulació d'aquesta via, activen la glucòlisi al mateix temps que inhibeixen l'apoptosi, com per exemple HIF-1 o Akt ¹⁴¹. La sobreactivació de la glucòlisi i la derivació del flux cap a la producció de lactat protegeix a les cèl·lules de l'apoptosi perquè evita la formació de ROS al mitocondri durant l'O₂PHOS. A part dels efectes descrits en el metabolisme de la glucosa, també s'ha descrit que HIF-1 interacciona amb la proteïna proapoptòtica Bid inhibint-la, contribuint també així a la resistència a l'apoptosi. En la mateixa línia,

Introducció

s'ha descrit que Akt inhibeix dues proteïnes proapoptòtiques, PUMA i GSK-3 (quinasa de la glicogen sintasa 3) i fosforila la proteïna Bad, que inhibeix l'apoptosi i contribueix a l'augment de la glicòlisi mitjançant l'activació de PFK1 ¹³⁰.

El citocrom c activa la via intrínseca de l'apoptosi, i la seva alliberació també és regulada pel metabolisme de la glucosa. Un augment en el flux de la via de les pentoses fosfat resulta en un increment de la producció de NADPH, que inhibeix l'activitat del citocrom c mantenint-lo en la seva forma reduïda, i per tant inactiu ¹⁴². D'altra banda, com a resposta al dany a l'ADN i a l'estrès, p53 activa TIGAR, el qual també desvia el flux de la glicòlisi cap a la via de les pentoses fosfat augmentant la producció de NADPH i incrementant així la resposta antioxidant per inhibir l'apoptosi generada per l'acumulació de ROS ¹⁴³. En resum, la reprogramació del metabolisme de la glucosa a les cèl·lules tumorals facilita la progressió del tumor no només activant vies que estimulen el creixement, sinó que també modulant vies que eviten la mort cel·lular i asseguruen la supervivència.

En càncer, l'apoptosi també pot ser regulada pel metabolisme dels lípids, especialment per les vies involucrades en la síntesi d'esfingolípid ¹³⁰. La ceramida, sintetitzada a partir de serina i palmitoil-CoA, és el metabòlit central de la síntesi de diferents tipus d'esfingolípid, com per exemple esfingomielines o glicofosfolípids, que tenen diferents funcions en el context de supervivència cel·lular. En les cèl·lules tumorals està afavorida la síntesi dels esfingolípid involucrats en l'evasió de l'apoptosi i la promoció del creixement cel·lular. Per exemple, s'ha observat que la producció d'esfingosina-1-fosfat (S1P) disminueix l'apoptosi inhibint la caspasa-3, i afavoreix la proliferació activant vies oncogèniques ^{144,145}.

5.2 Metabolisme de les cèl·lules tumorals

Les cèl·lules tumorals han d'acumular un seguit de característiques anomenades Hallmarks per tal de sostenir el creixement descontrolat i la reprogramació metabòlica és una d'elles. Aquesta reprogramació metabòlica no només aporta a les cèl·lules tumorals l'energia per sostenir la proliferació descontrolada sinó que també participa en la regulació d'altres processos cel·lulars com l'apoptosi o la regulació de l'estrès

Introducció

cel·lular. A continuació es detallen els canvis metabòlics i adaptacions que sofreixen les cèl·lules tumorals.

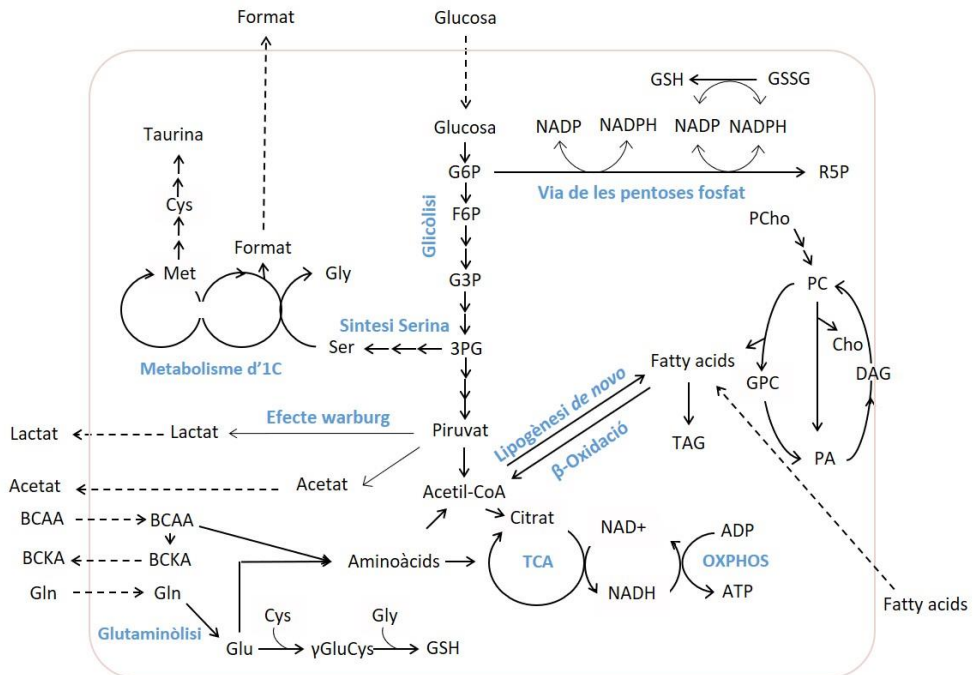


Figura 6. Esquema de les principals vies metabòliques reprogramades en el càncer.

5.2.1 Metabolisme de la glucosa i l'Efecte Warburg.

Fa gairebé un segle que Otto Warburg va descriure la glucòlisi aeròbica, o també coneguda com a l'Efecte Warburg, un concepte clau del metabolisme de les cèl·lules tumorals. Descriu com les cèl·lules canceroses es basen en la glucòlisi aeròbia, és a dir, la conversió de glucosa a lactat en presència d'oxigen, per a la producció d'ATP, en contrast amb les cèl·lules no tumorals que es basen en la fosforilació oxidativa (OXPHOS) ¹⁴⁶. Basar la producció d'ATP en la glucòlisi disminueix l'eficiència, perquè per cada molècula de glucosa es generen 36 molècules d'ATP a través de l'OXPHOS i només 2 mitjançant la glucòlisi aeròbica. El metabolisme de la glucosa es considera un dels aspectes més importants del metabolisme de les cèl·lules tumorals perquè proporciona metabòlits intermediaris i precursors per a altres vies metabòliques clau, com per exemple, la síntesi d'aminoàcids, nucleòtids o lípids ¹⁴⁷. Per tant, és rellevant entendre quin benefici aporta a les cèl·lules tumorals aquest canvi en el metabolisme que els hi proporciona menys energia en forma d'ATP. Primer de tot, permet a les

Introducció

cèl·lules tumorals sobreviure en condicions de fluctuació d'oxigen i s'ha descrit que la generació de lactat és una reacció química més ràpida que l'OXPPOS i, per tant, permet obtenir l'energia necessària per mantenir el creixement descontrolat més ràpidament¹⁴⁸. A més, l'elevada producció de lactat i la seva secreció al medi extracel·lular genera un microambient àcid on només poden créixer cèl·lules resistents a aquesta acidesa, facilitant la capacitat invasiva del tumor. Aquest microambient facilita la transformació de les cèl·lules adjacents que poden participar en vies metabòliques complementàries facilitant el reciclatge del metabolisme anaeròbic i proporcionant metabòlits necessaris per a la supervivència i el creixement cel·lular¹⁴¹. La glucòlisi aeròbica també permet la desviació de metabòlits de la glucòlisi a la via de les pentoses fosfat (detallada més endavant) on es genera NADPH que participa en la resposta antioxidant cel·lular. A més, també permet l'acumulació d'intermediaris necessaris per a les reaccions anabòliques¹⁴⁹.

Una qüestió clau és com i qui produeix aquesta reprogramació metabòlica. En l'ambient tumoral hi ha moltes zones amb una vascularització inadequada i són clau com a iniciadores de la transformació metabòlica. Les condicions d'hipòxia generades en aquestes zones activen respostes cel·lulars regulades per oncogens i supressors de tumors per combatre-la o per adaptar-s'hi¹⁵⁰. Alguns exemples d'aquests reguladors són el proto-oncogen Myc, el factor de transcripció induïble per hipòxia (HIF-1), la via PI3K/Akt/mTOR i el supressor de tumors p53, tots s'expressen de manera anormal en les cèl·lules tumorals. El factor de creixement Myc (codificat per l'oncogen *c-myc*) i la via de senyalització PI3K/Akt/mTOR es troben implicades en el creixement i la proliferació cel·lular, però també tenen efectes específics sobre la glucòlisi. Myc afavoreix la sobreexpressió dels transportadors de glucosa (GLUT) i els enzims glicolítics hexoquinasa 2 (HK2), fosfofructoquinasa (PFK), lactat deshidrogenasa A (LDHA) i piruvat quinasa deshidrogenasa 1 (PDK1)¹⁵¹. La via PI3K/Akt/mTOR augmenta l'eficiència dels enzims HK2 i PFK. El supressor de tumors p53 inhibeix la glucòlisi i afavoreix l'OXPPOS mitjançant la disminució de l'expressió de GLUT1, GLUT4 i HK2¹⁵². En molts tumors p53 perd la seva funció a causa d'una mutació i, per tant, la falta de la seva acció afavoreix l'augment de la glucòlisi. La regulació d'aquestes proteïnes i vies de senyalització es troben relacionades amb HIF-1, ja que, pot inhibir Myc en condicions d'hipòxia, o pot ser activada per Akt i inhibida per p53. El paper principal

Introducció

d'HIF-1 és assegurar la supervivència de les cèl·lules en condicions d'hipòxia, i per això augmenta l'expressió de proteïnes com l'HK2, PFK1, l'aldolasa A (ALDOA), la fosfoglicerat quinasa 1 (PGK1), la piruvat quinasa (PK), LDHA, i inhibeix la piruvat deshidrogenasa (PDH), de manera que disminueix el flux cap al cicle de l'àcid cítric (TCA) ¹⁵³. HIF-1 també facilita la captació de glucosa afavorint l'expressió dels seus transportadors, com GLUT-1, i augmenta l'expressió dels transportadors de monocarboxilat (MCT), com MCT4, per facilitar la secreció de lactat. HIF1 també disminueix OXPHOS, inhibint el Complex I de la cadena de transport d'electrons (ETC) ¹⁵⁴.

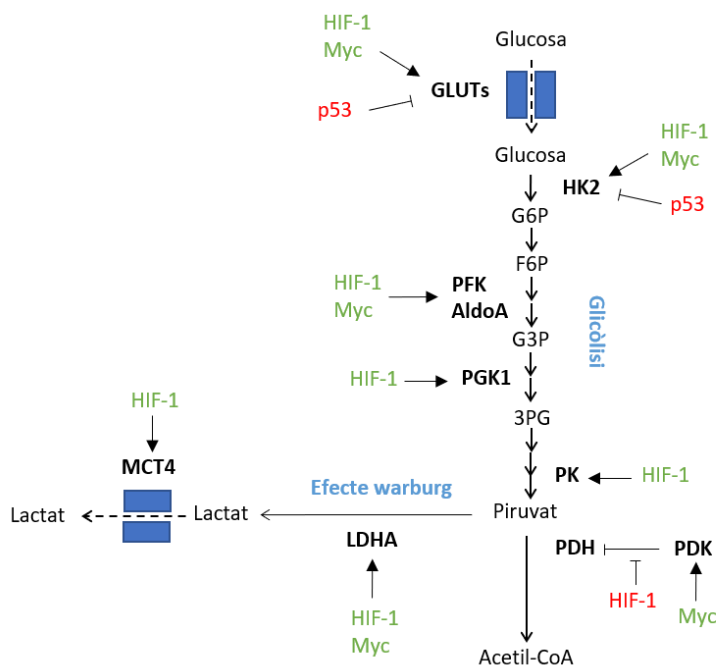


Figura 7. Regulació del metabolisme de la glucosa.

L'efecte Warburg, en els seus inicis, definia un canvi del metabolisme afavorint la glucòlisi aeròbia, tal com s'ha explicat, i una pèrdua de la funció mitocondrial per part de les cèl·lules tumorals. Aquesta última part ha estat reformulada atès que també s'ha observat activitat mitocondrial en aquestes cèl·lules i es parla de "plasticitat metabòlica" ¹⁵⁵. Aquest nou concepte defineix la capacitat que tenen les cèl·lules tumorals en canviar el seu metabolisme entre la glucòlisi aeròbia i l'OXPHOS segons les seves necessitats o, fins i tot, realitzar ambdues vies a la vegada ¹⁵⁶. En aquest sentit,

Introducció

s'ha descrit una possible cooperació metabòlica entre cèl·lules adjacents definida com a Efecte Warburg invers. S'ha vist que dins del tumor hi ha cèl·lules amb un fenotip glicolític, que alliberarien lactat, i d'altres amb un fenotip oxidatiu que podrien captar-lo per obtenir-ne energia a través de l'OXPPOS i assegurar així el creixement i proliferació tumoral. Aquest mecanisme de compartimentalització metabòlica emfatitza la importància de la interacció entre cèl·lules i la comprensió del metabolisme tumoral dins del microambient ^{157,158}.

5.2.2 Metabolisme de la glutamina

Una altra font d'energia clau per les cèl·lules tumorals és l'aminoàcid essencial glutamina (Gln) i de fet, és l'aminoàcid més consumit per les cèl·lules tumorals, i la seva dependència s'ha descrit com a "addicció a la glutamina" ¹⁵⁹. Aquest aminoàcid té un paper crucial per a la supervivència cel·lular perquè intervé en vies de transducció de senyals, s'utilitza per a la síntesi de proteïnes, lípids i nucleòtids i té una funció anapleròtica, és a dir, proporciona intermediaris al TCA com l' α -cetoglutarat (α -KG). A més, la glutamina també es troba involucrada en la síntesi del glutatió (GSH), una molècula antioxidant molt important ¹⁶⁰.

Com a resultat dels canvis esmentats anteriorment en el metabolisme de la glucosa, gran part del piruvat generat a través de la glucòlisi es converteix en àcid làctic en lloc d'utilitzar-se per a la producció d'acetil-CoA i, finalment, en citrat per entrar al TCA. Aquesta situació pot comprometre els nivells dels metabòlits involucrats en el TCA, importants per a la síntesi de biomolècules que assegurin la proliferació cel·lular. La glutaminòlisi, degradació de la glutamina a glutamat, proporciona una font alternativa de precursors al TCA mitjançant la incorporació de l' α -KG produït a partir del glutamat¹⁶¹.

La reprogramació de la cèl·lula per afavorir la glutaminòlisi s'aconsegueix mitjançant diversos oncogens i es creu que està coordinada amb la reprogramació de la glucosa. Un dels principals factors reguladors és Myc que pot estimular-la de manera directa augmentant l'expressió del transportador de la glutamina (SLC1A5), o de manera indirecta inhibint l'inhibidor de l'enzim glutaminasa (GLS1) ¹⁵¹. Un altre gen que participa en la regulació de la glutaminòlisi és p53, que induïx l'expressió de l'isoenzim GLS2, la qual es troba disminuïda en molts tipus de càncers ¹⁶².

Introducció

5.2.3 Via de les pentoses fosfat

La via de les pentoses fosfat (PPP de l'anglès *pentose phosphate pathway*) és una via derivada de la glucòlisi que té un paper important en el metabolisme de la glucosa i, per tant, en el metabolisme del càncer. Un cop la glucosa s'ha convertit a glucosa-6-fosfat (G6P) per l'HK, pot desviar-se de la glucòlisi i entrar a PPP, via que serveix per generar NADPH i precursors per a la síntesi de lípids i nucleòtids. Amb la producció de NADPH s'incrementa la resposta antioxidant de la cèl·lula, ja que, permet la regeneració del glutatió oxidat. Aquest increment de la resposta antioxidant afavoreix la proliferació de les cèl·lules tumorals, ja que, són cèl·lules amb uns nivells d'estrès oxidatiu elevats ¹⁶³.

La via de les pentoses fosfat consta de dues branques; la branca oxidativa i la no oxidativa. La branca oxidativa consta de tres reaccions irreversibles que oxiden la G6P fins a ribosa-5-fosfat (R5P) alliberant 2 molècules de NADPH ¹⁶⁴. Els principals enzims que la regulen són la glucosa-6-fosfat deshidrogenada (G6PDH) i la 6-fosfogluconat deshidrogenasa (PGD) i la seva expressió es troba augmentada en diferents càncers, entre ells el de mama ¹⁶⁵. La branca oxidativa es troba regulada per diversos oncogens i gens supressors de tumors, entre ells destaquen p53, la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK), PI3K, mTORC1 i KRAS ¹⁶⁶. Els dos primers actuen com a inhibidors de la via i, en càncer, les mutacions afavoreixen la seva pèrdua de funció, permetent l'activació de la via metabòlica. En canvi, l'activació de PI3K, mTORC1 i KRAS regula positivament la PPP. A més, l'enzim G6PDH és sensible als nivells de NADPH/NADP⁺, on nivells elevats de NADP⁺ activen G6PDH, augmentant el flux de la via ¹⁶⁷.

La branca no oxidativa de la via de les pentoses fosfat és reversible i parteix de la R5P per generar intermediaris glicolítics i precursors de nucleòtids. Els enzims involucrats en aquesta via són l'enzim transcetolasa (TKT) i la transaldolasa (TALDO). El fet que sigui una via reversible permet que els metabòlits glicolítics com la fructosa-6-fosfat (F6P) i el gliceraldehid-3-fosfat (G3P) puguin ser intercanviats entre la PPP i la glucòlisi, permetent adaptar el flux metabòlic segons les necessitats cel·lulars ¹⁶⁴. L'expressió de TKT i TALDO augmenta en resposta a l'activació del factor nuclear NRF2 (de l'anglès, *Erythroid 2-Like 2*), un sensor important de l'estrès oxidatiu ¹⁶⁶.

Introducció

La via de les pentoses fosfat i la glucòlisi interaccionen a través de la branca no oxidativa, i aquesta particularitat confereix a les cèl·lules una plasticitat metabòlica per fer front a les necessitats de creixement i proliferació cel·lular. Per exemple, en situacions d'elevat estrès oxidatiu, l'enzim PFK1 és inhibit per tal d'incrementar l'acumulació d'intermediaris de la glucòlisi i desviar-los així cap a la via de les pentoses fosfat, i generar NADPH per millorar la resposta antioxidant ¹⁶⁸.

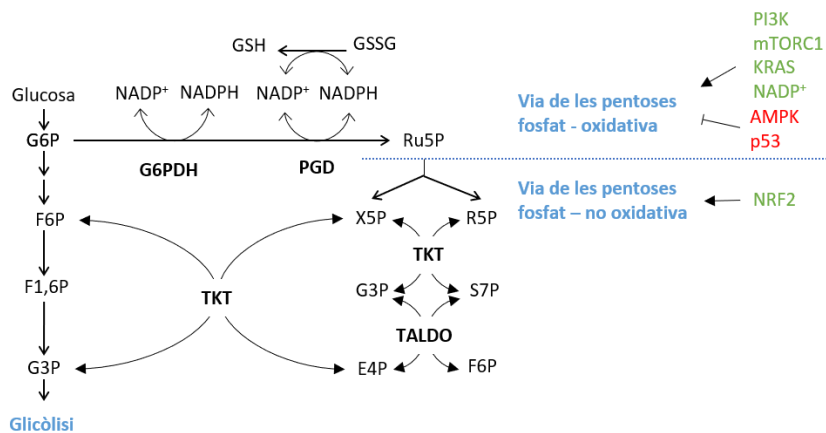


Figura 8. Regulació de la via de les pentoses fosfat

5.2.4 Cicle de l'àcid cítric (TCA)

El cicle de l'àcid cítric, o Cicle de Krebs, és el punt central del metabolisme, té lloc a la matriu mitocondrial i és una font de metabòlits intermediaris com el citrat, l'oxaloacetat i el succinil-CoA, fonamentals per a la síntesi de macromolècules. A més, proporciona poder reductor en forma de NADH i FADH₂ que es redueixen en l'OXPHOS per a la producció d'ATP. En les cèl·lules tumorals, tot i trobar-se desacoblat de la glucòlisi en alguns casos, és una via clau per donar suport a l'augment de demandes metabòliques ¹⁶⁹.

Les cèl·lules tumorals i les no tumorals poden utilitzar diferents molècules, inclòs la glucosa, la glutamina i els àcids grassos, per alimentar el cicle del TCA, però la diferència entre els dos tipus cel·lulars són les taxes d'utilització de cada molècula. Per exemple, les cèl·lules no tumorals tenen preferència per a l'oxidació completa de la glucosa al TCA, mentre que les cèl·lules tumorals, tal com s'ha explicat, desvien l'oxidació de la glucosa cap a la producció de lactat i la glutamina és el principal metabòlit encarregat de proporcionar molècules al TCA. A més, les cèl·lules tumorals

Introducció

també poden usar l'oxidació dels àcids grassos per obtenir acetil-CoA per al TCA. Aquesta reprogramació metabòlica permet una major utilització d'aquestes fonts de combustible alternatives i, per tant, la continuïtat del flux a través del cicle del TCA per donar suport al creixement cel·lular ¹⁷⁰.

En la regulació del cicle del TCA hi participen Myc, HIF-1 i p53, entre d'altres actuant en l'Efecte Warburg i la glutaminòlisi, com ja s'ha comentat anteriorment però també promovent l'oxidació dels àcids grassos per assegurar la formació d'acetil-CoA ^{151,171}.

Hi ha algunes mutacions dels enzims del cicle del TCA associades a una major proliferació tumoral, com per exemple, mutacions en l'enzim aconitasa (ACO2), citrat sintasa (CS), succinat deshidrogenasa (SDH), fumarat hidratasa (FH) i isocitrat deshidrogenasa (IDH). En particular, les mutacions en els enzims SDH i IDH produeixen una major producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) mentre que, les mutacions en FH provoquen l'acumulació de fumarat, que pot actuar com a oncometabòlit i permetre l'estabilització d'HIF ¹⁷².

5.2.5 Acetat

Les cèl·lules tumorals també són capaces de metabolitzar l'acetat exogen, i aquest metabòlit es troba involucrat en la modificació posttraduccional de proteïnes, així com en la síntesi d'àcids grassos, nucleòtids i aminoàcids. L'acetat és captat per les cèl·lules i convertit a acetil-CoA mitjançant l'acetil-coA sintetasa 1 (ACSS1) localitzada al mitocondri i l'ACSS2, localitzada al citosol ¹⁷³. Les dues isoformes es troben elevades en cèl·lules tumorals i tenen un paper important en la supervivència cel·lular sota hipòxia o estrès nutricional ¹⁷⁴.

L'acetat també representa una altra via de plasticitat metabòlica per a les cèl·lules canceroses. En condicions normals, l'acetil-CoA necessari és obtingut de l'oxidació de la glucosa, però en condicions d'hipòxia o estrès nutricional aquesta necessitat es pot suplir a partir de l'acetat ¹⁷⁵. Les cèl·lules tumorals poden aconseguir mitjançant la desacetilació de les histones, però la contribució d'aquesta reacció en el *pool* cel·lular d'acetat és mínima. Recentment, s'ha descrit una via de síntesi *de novo* de l'acetat a partir del piruvat, sobretot en situacions d'*overflow* o desbordament metabòlic, on es produeixen més intermediaris dels necessaris i són acumulats o secretats. En un

Introducció

microambient tumoral àcid, la cèl·lula pot alliberar acetat per alleugerir l'estrès metabòlic, afavorint la supervivència i el creixement cel·lular ¹⁷³.

5.2.6 Metabolisme d'1C (cicle del folat i la metionina)

El metabolisme d'un carboni (1C) és el cicle i transferència de grups d'1C entre diferents grups acceptors de vies anabòliques. Controla la síntesi de purines, timidina, glutatió i S-adenosilmetionina (SAM), metabòlits involucrats en la síntesi de proteïnes, lípids, àcids nucleics i altres cofactors. A més, contribueix al balanç energètic subministrant ATP i NADPH a la cèl·lula, fet que li permet aportar plasticitat metabòlica i ajustar la seva activitat en funció de l'estat redox ¹⁷⁶.

Entre les molècules donadores de grups d'1C s'hi troben alguns aminoàcids no essencials (NEAA) com la serina, la glicina i la metionina que cedeixen els seus carbonis al cicle del folat i la metionina. Aquests dos cicles, que es troben interconnectats, poden redistribuir aquests grups de carboni per generar els productes clau del metabolisme d'1C, com per exemple, nucleòtids, glutatió, SAM, NADPH i ATP ¹⁷⁷.

La serina és el principal donant de grups d'1C i l'aminoàcid central d'aquesta via metabòlica i, per tant, la regulació de la seva biodisponibilitat és crucial. Les cèl·lules poden obtenir la serina mitjançant la seva captació de l'espai extracel·lular, i també per síntesi *de novo*, dues vies típiques de les cèl·lules tumorals. La síntesi de la serina es realitza a partir d'un intermediari de la glucòlisi, el 3-fosfoglicerat (3-PG), i consta de tres reaccions catalitzades pels enzims fosfoglicerat deshidrogenasa (PHGDH), la fosfoserina aminotransferasa (PSAT1) i la fosfoserina fosfatasa (PSPH). Les cèl·lules tumorals incrementen la síntesi de la serina augmentant l'expressió d'aquests enzims, i en el cas del càncer de mama s'ha relacionat la sobreexpressió de l'enzim PHGDH amb menor supervivència ¹⁷⁸. La biosíntesi de la serina s'indueix en resposta a l'estrès metabòlic, esgotament de glucosa, glutamina o de la mateixa serina. La seva regulació es troba estretament relacionada amb la glucòlisi, ja que, el metabòlit inicial per a la síntesi és un intermediari d'aquesta via. Per tant, per tal de poder assegurar nivells de 3-PG suficients per a la síntesi de la serina és necessari reduir el flux a través de l'últim pas de la glucòlisi i assegurar així, l'acumulació dels intermediaris d'aquesta via ¹⁷⁶.

Introducció

Un altre donant de grups de carboni és la glicina, precursora de la producció de glutatió i purines, i per tant es troba involucrada en la proliferació cel·lular i la resposta antioxidant. La glicina també pot ser captada pels transportadors de membrana o bé, es pot generar a partir de la serina. Un cop captada o sintetitzada, la glicina pot donar carbonis als cicles del folat i de la metionina ¹⁷⁷.

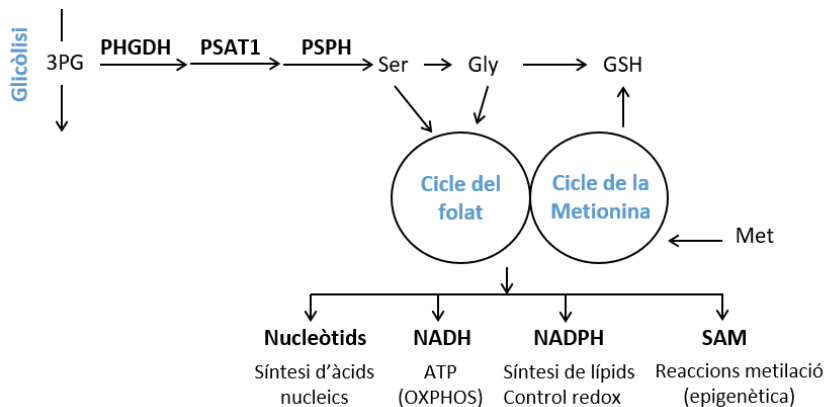


Figura 9. Síntesi de la serina i metabolisme d'1 carboni.

En les cèl·lules tumorals, aquests dos cicles es troben alterats i, fins i tot, s'ha descrit un possible fenotip d'addició a la metionina exògena, vist que l'alt flux d'aquests cicles fa que se superi la capacitat de la cèl·lula per regenerar-la ¹⁴⁸. La regulació del metabolisme d'1C es troba molt lligada a altres vies cel·lulars, com per exemple la glucòlisi. Hi ha diverses reaccions d'aquesta via que contribueixen a la generació de NADH, NADPH i ATP. El NADH addicional produït en el cicle del folat es pot desviar a l'OXPPOS per a la producció d'ATP. En el cas del NADPH citosòlic pot ser utilitzat per a la síntesi d'àcids grassos o per detoxificar ROS mitjançant la síntesi de glutatió. El glutatió és un tripèptid format per glutamat, glicina i cisteïna i és un potent antioxidant ¹⁷⁹.

5.2.7 Metabolisme dels aminoàcids de cadena ramificada (BCAA)

Els aminoàcids de cadena ramificada (*Branched Chain Amino Acid*, BCAA) inclouen els aminoàcids essencials valina, leucina i isoleucina i tenen un paper important en la proliferació de les cèl·lules tumorals. Funcionen com a donadors de grups de nitrogen per a la síntesi de nucleòtids, poden ser incorporats en les proteïnes i poden produir metabòlits cel·lulars rellevants com el glutamat ¹⁸⁰. La degradació dels BCAA en els seus

Introducció

corresponents α -cetoàcids de cadena ramificada (BCKA) és realitzada pels enzims aminotransferasa ramificada 1 (BCAT1) al citosol, i BCAT2 al mitocondri. Dels dos enzims, BCAT1 és la principal isoforma implicada en el creixement tumoral i s'ha proposat com a marcador pronòstic de cèl·lules canceroses ¹⁸¹.

En càncer de mama, s'ha descrit que les cèl·lules tumorals afavoreixen l'ús directe dels BCAA abans que el seu catabolisme. En aquest tipus de càncer l'enzim BCAT1 catalitza la re-aminació dels BCKA per obtenir BCAA, l'acumulació dels quals afavoreix el creixement tumoral facilitant la síntesi de proteïnes. Tot i això, igual que passava amb l'Efecte Warburg, s'ha observat que dins d'un mateix tumor poden haver-hi subpoblacions cel·lulars on unes produeixen BCKA i les altres els aprofiten per aconseguir BCAA a partir de la seva re-aminació ¹⁸⁰.

Estudis *in vitro* en cèl·lules tumorals de càncer de mama han revelat que prop d'un 30% de l'energia produïda mitjançant OXPHOS provenia de la degradació dels BCAA. A més, prop d'un 60% del mevalonat, un precursor del colesterol, sintetitzat provenia de la degradació de la leucina i també es va veure que es produïen quantitats importants d'acetoacetat que podria ser utilitzat per a la síntesi de lípids ¹⁸². Així doncs, la degradació dels BCAA podria ser una font d'energia, de carbonis i de precursors de biomolècules necessaris per a la proliferació d'algunes cèl·lules tumorals.

5.2.8 Metabolisme dels lípids

L'alteració del metabolisme dels lípids és una de les modificacions metabòliques més pronunciada del càncer i es troba involucrada en el creixement tumoral. Els lípids, inclosos els esterols, mono/di/triglicèrids, fosfolípids i glicolípid són essencials per a les cèl·lules; serveixen com a font d'energia, com a components de les membranes biològiques o com a molècules de senyalització ¹⁸³. A continuació es descriuen els diferents aspectes del metabolisme dels lípids que es troben modificats en les cèl·lules tumorals.

5.2.8.1 Adquisició dels lípids; captació i lipogènesi de novo

Les cèl·lules poden adquirir lípids de dues maneres; a partir de la síntesi *de novo* o mitjançant la seva captació. Normalment, les cèl·lules obtenen els àcids grassos de fonts externes, com la dieta o dels lípids sintetitzats pel fetge, però les cèl·lules

Introducció

tumorals tenen la capacitat de reactivar la lipogènesi *de novo* tornant-les independents de les fonts exògenes per proliferar més de pressa. La síntesi d'àcids grassos comença a partir de l'acetil-CoA citoplasmàtic, generat a partir de glucosa, glutamina o acetat. Aquest acetil-CoA es converteix en malonil-CoA i després en palmitat, un àcid gras saturat de 16 carbonis, mitjançant l'actuació dels enzims acetil-CoA carboxilasa (ACC) i l'àcid gras sintasa (FASN), respectivament. El palmitat pot ser allargat per l'acció de les elongases, o desaturat per l'acció de les desaturases, per formar altres àcids grassos que al seu temps són precursors d'altres molècules cel·lulars importants com el colesterol, els eicosanoides i les prostaglandines ¹⁸⁴.

Les cèl·lules tumorals activen la lipogènesi *de novo* via l'activació de proteïnes d'unio a elements reguladors de l'esterol (SREBP), incrementant la transcripció dels enzims implicats, especialment l'ACC, FASN i estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1). L'activació d'SREBP és regulada per vies de senyalització oncogèniques, especialment PI3K/Akt/mTORC1, que incrementa l'expressió dels enzims involucrats en la síntesi d'àcids grassos i activa l'ATP-citrat liasa (ACLY), un enzim que catalitza la producció d'acetil-Coa a partir del citrat. A més, aquesta via també incrementa la producció de NADPH, utilitzat com a factor en la síntesi d'àcids grassos, mitjançant l'activació de NRF2 ¹⁸⁵.

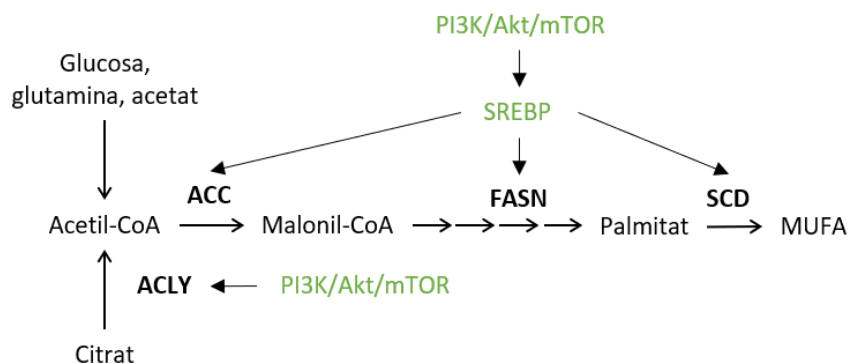


Figura 10. Regulació de la lipogènesi *de novo* en cèl·lules tumorals.

L'augment de la síntesi *de novo* proporciona a les cèl·lules tumorals la capacitat d'activar altres vies de biosíntesi per generar lípids amb diferents funcions que els permetin l'adaptació al seu entorn i garanteixi la proliferació ¹⁸⁶. L'augment de la síntesi

Introducció

d'àcids grassos redueix el nombre d'àcids grassos poliinsaturats (PUFA) i n'augmenta el nombre dels monoinsaturats (MUFA). Això ajuda a proporcionar protecció contra la peroxidació lipídica, ja que, en presència de ROS els PUFA són més susceptibles que els MUFA a aquest fenomen ¹⁸⁷.

L'altra font d'adquisició dels lípids és mitjançant la seva captació, que també es troba incrementada en les cèl·lules tumorals. Aquesta captació es pot produir a través de diferents vies; mitjançant transportadors especialitzats com la translocasa d'àcids grassos CD36 o les proteïnes de transport d'àcids grassos (FATPs), o mitjançant l'endocitosi de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL). La captació de lípids exògens permet als tumors mantenir l'homeòstasi del metabolisme lipídic fins i tot en moments d'estrès. Per exemple, en condicions d'hipòxia, es dificulta la dessaturació dels àcids grassos, catalitzada per la SCD-1, perquè requereix oxigen i la seva captació del medi extracel·lular permet compensar-ho. Aquest mecanisme de captació es troba regulat per HIF-1 que facilita la sobreexpressió dels transportadors i de proteïnes d'unió als lípids, com la proteïna d'unió als àcids grassos 4 (FABP4) ¹⁸⁴.

5.2.8.2 Emmagatzematge i exportació de lípids

A conseqüència de l'augment de la síntesi i la captació de lípids, es produeix un excés que les cèl·lules tumorals han d'emmagatzemar en forma de gotes lipídiques, o *lipid droplets* en anglès. Els lípids hi són emmagatzemats en forma de triglicèrids i èsters de colesterol. Les gotes lipídiques ajuden a mantenir l'homeòstasi lipídica, a prevenir la lipotoxicitat, a regular l'autofàgia, a mantenir l'homeòstasi de la membrana i del reticle endoplasmàtic i també proporcionen una font d'ATP i NADPH a través de la seva degradació en temps d'estrès metabòlic. S'ha descrit que, diferents tipus de càncer, les cèl·lules tumorals presenten un augment de les gotes lipídiques en comparació a les cèl·lules no canceroses ¹⁸⁵.

5.2.8.3 Lipòlisi

La lipòlisi és el procés de descomposició dels lípids emmagatzemats en àcids grassos i glicerol mitjançant l'acció de lipases. L'adrenalina, el glucagó o l'hormona del creixement estimulen la lipòlisi activant les lipases. La primera lipasa a actuar és la lipasa de triglicèrids adiposos (ATGL) i és l'encarregada de trencar els triacilglicèrids a diacilglicèrids, a continuació actua la lipasa sensible a hormones (HSL) que allibera

Introducció

monoacilglicèrids i, finalment, la lipasa de monoacilglicerols (MGL) que allibera glicerol. El resultat de l'acció d'aquestes lipases dona tres àcids grassos i una molècula de glicerol. En el càncer de mama, s'ha observat que aquesta via es troba desregulada, facilitant la producció i l'acumulació d'àcids grassos com també la invasió i la metàstasi¹⁸⁵.

5.2.8.4 Oxidació dels àcids grassos (β -oxidació)

Tot i que el paper de la síntesi dels àcids grassos en el càncer s'ha estudiat àmpliament, el paper de la β -oxidació encara no s'ha definit clarament i és una nova àrea d'estudi del metabolisme del càncer. La β -oxidació és la descomposició dels àcids grassos fins a acetil-CoA, proporcionant a la cèl·lula energia en forma d'ATP i poder reductor en forma de NADPH. Com s'ha mencionat anteriorment, en les cèl·lules tumorals glicolítiques l'ATP pot ser produït mitjançant l'Efecte Warburg i el NADPH per altres vies metabòliques, fet que suggereix que l'oxidació dels àcids grassos no té un paper clau en el metabolisme tumoral. Així i tot, les noves evidències apunten que pot tenir un paper més important en el creixement i metàstasi del càncer del què s'havia considerat¹⁸⁵.

Estudis recents han demostrat que en càncer hi ha un augment de l'expressió de diferents enzims involucrats en l'oxidació dels àcids grassos, com per exemple, la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). En la mateixa línia d'aquesta observació, diversos tipus de càncer, com ara el càncer de mama triple negatiu, presenten un augment de la β -oxidació i en depenen com a font d'ATP per a un creixement ràpid. També s'ha observat aquesta tendència en tumors no glicolítics, com els del càncer de pròstata. L'augment de l'expressió dels enzims involucrats en l'oxidació dels àcids grassos i la seva regulació es pot aconseguir mitjançant la sobreexpressió de c-Myc¹⁸³.

5.2.9 Via del mevalonat

La via del mevalonat permet la síntesi de lípids importants per al funcionament cel·lular, com el colesterol, la vitamina D i les lipoproteïnes i és una via alterada en el càncer¹⁸³.

El mevalonat se sintetitza a partir del 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (HMG-CoA) per la HMG-CoA reductasa (HMG-CoAR). Posteriorment, és metabolitzat a farnesil

Introducció

pirofosfat (FPP), un precursor d'esterols com per exemple el colesterol, component rellevant de les membranes cel·lulars, entre altres funcions. El FPP pot continuar sent metabolitzat fins a donar precursors per a modificacions posttraduccional de proteïnes, algunes implicades en diversos aspectes del desenvolupament i la progressió del tumor ¹⁸⁸. Molts enzims de la vida del mevalonat solen estar sobreexpressats en càncer. La transcripció d'aquests enzims està controlada per SREBPs i per la via de senyalització PI3K/Akt/mTORC1, de manera similar a la lipogènesi *de novo* ¹⁸⁸. L'augment de l'expressió de HMGCR en càncer facilita una major síntesi de colesterol, precursor per a la síntesi de membrana en les cèl·lules en divisió ¹⁸⁹.



HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi i objectius

Hipòtesi i objectius

Aquest treball s'emmarca dins del projecte d'investigació del Grup Multidisciplinari per a l'Estudi del Càncer de Mama sobre "Els lípids de la dieta i el càncer de mama". La investigació s'ha realitzat en part utilitzant els tumors obtinguts prèviament en el model experimental de carcinomes mamaris induïts amb DMBA en rates Sprague-Dawley.

Estudis previs del grup han descrit que la dieta hiperlipídica d'oli de blat de moro, rica en PUFA n-6, exerceix un efecte estimulador de la carcinogènesi mamària experimental. En canvi, la dieta hiperlipídica d'oli d'oliva verge extra, rica en MUFA i compostos minoritaris bioactius, podria exercir un efecte potencialment protector. Els mecanismes d'acció pels quals els lípids modulen el seu paper en el desenvolupament dels tumors no estan del tots elucidats, tot i que resultats previs del grup han descrit canvis en l'expressió de gens implicats en diferents vies de senyalització cel·lular, com la proliferació o l'apoptosi, i en el metabolisme. D'acord amb aquests resultats s'ha formulat la nova hipòtesi de treball:

"Les dietes hiperlipídiques modifiquen el metabolisme i l'apoptosi tumoral. Aquests canvis són diferents en funció de la dieta consumida, suggerint així una especificitat del tipus de greix subministrat."

L'objectiu general d'aquest treball és:

Investigar l'efecte de les dietes hiperlipídiques i els seus components en la carcinogènesi de tumors de càncer de mama experimental i elucidar els mecanismes involucrats, especialment en el metabolisme i l'apoptosi, a través d'estudis *in vivo* i *in vitro*.

Els objectius específics són:

1. Investigar l'impacte d'aquestes dietes en les principals vies metabòliques en els tumors mamaris experimentals, determinant els nivells d'expressió gènica, proteica i/o activitat dels enzims més rellevants (*Article científic I*).

Hipòtesi i objectius

2. Analitzar els efectes metabòlics de les dietes hiperlipídiques en tumors mamaris experimentals mitjançant estudis de metabolòmica no dirigida (*Resultats no publicats*).
3. Avaluar *in vivo* i *in vitro* els efectes d'aquestes dietes hiperlipídiques i dels seus components principals en l'apoptosi (*Article científic II*).

Aquest objectiu es concretarà en:

- 3.a. Determinar *in vivo* els nivells d'expressió de proteïnes que controlen diferents vies apoptòtiques en els tumors experimentals.
 - 3.b. Analitzar *in vitro* els efectes d'àcids grassos i polifenols de l'OOVE en l'apoptosi de cèl·lules representatives de diferents subtipus de càncer de mama humana.
4. Estudiar *in vitro* els efectes metabòlics de polifenols de l'OOVE en les mateixes línies cel·lulars mitjançant estudis de metabolòmica no dirigida (*Article científic III*).



RESULTATS

Resultats

Article científic 1

A high extra-virgin olive oil diet induces changes in metabolic pathways of experimental mammary tumors

Maite Garcia-Guasch^a, Lourdes Navarro^a, Vanessa Rivero^a, Irmgard Costa^b, Eduard Escrich^a, Raquel Moral^a *

^a*Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain.*

^b*Department of Pathology, Corporació Parc Taulí-UDIAT, Sabadell, Barcelona, Spain.*

Plantejament i objectiu

A nivell molecular, les cèl·lules tumorals presenten una reprogramació metabòlica que permet sostenir la proliferació continuada, característica que és considerada un *Hallmark* del càncer. La més coneguda és l'anomenat Efecte Warburg, i consisteix en la reprogramació del metabolisme de la glucosa. També presenten alteracions en el metabolisme d'aminoàcids, sobretot de la glutamina, i del metabolisme d'un carboni, juntament amb un augment de la captació de lípids, de la lipogènesi i la síntesi de colesterol.

Estudis previs del grup han descrit canvis diferencials en el grau de malignitat clínica i morfològica dels tumors mamaris induïts experimentalment per efecte de dues dietes hiperlipídiques, una d'oli de blat de moro (rica en PUFA n-6) i l'altre d'OOVE (rica en MUFA i components bioactius). A més, també s'han observat diferències en l'expressió de gens relacionats amb diferents vies cel·lulars com la proliferació, l'apoptosi i metabolisme. L'objectiu d'aquest treball és estudiar la influència de les dues dietes hiperlipídiques en les principals vies del metabolisme dels tumors mamaris induïts experimentalment en rata amb DMBA.

Metodologia

Aquest treball s'ha realitzat amb els tumors induïts en rates femelles Sprague-Dawley alimentades amb tres dietes semisintètiques. Els animals van ser distribuïts en cinc grups experimentals en funció de la dieta i del moment de la intervenció dietètica (des

Resultats

del deslletament o després de la inducció, Veure Annex 1): dieta control “low-fat” (grup LF), dieta hiperlipídica de blat de moro “high corn oil” (grups HCO, LF-HCO), i dieta hiperlipídica d’OOVE “high olive oil” (grups HOO i LF-HOO; veure Annex 2 per més detall).

En aquest treball, es van validar i ampliar els paràmetres sobre el grau de malignitat clínica i morfològiques de les mostres tumorals, i es van caracteritzar els tumors inclosos en l’estudi molecular. Tot seguit, a partir dels extractes tumorals, es va estudiar els nivells d’expressió gènica, proteica i activitat d’enzims involucrats en les principals vies de. Els nivells d’expressió gènica es van estudiar a partir de l’ARN total per PCR de temps real. A partir d’homogenats tumorals, l’expressió proteica es va analitzar per Western Blot, i es va determinar l’activitat enzimàtica utilitzant assajos comercials. D’altra banda, es van realitzar experiments *in vitro* usant les cèl·lules MCF-7, que van ser cultivades 48 h en condicions control, amb 1 mM d’àcids grassos (àcid oleic o àcid linoleic), o amb 0,1% d’oli (blat de moro o OOVE). L’expressió de proteïnes va ser analitzada per Western blot en els extractes cel·lulars. Totes les dades van ser analitzades estadísticament fent servir el programa R Deducer. En tots els casos, els nivells de significança estadística es van establir a $p < 0,05$.

Resultats

L’estudi dels paràmetres anatomopatològics i clínics de la carcinogènesi va validar i ampliar els resultats previs, i a més va mostrar que els tumors utilitzats en els estudis moleculars representaven les característiques d’agressivitat clínica i morfològica de la sèrie experimental. Els resultats van evidenciar un efecte diferencial pel tipus de lípid consumit, de manera que els tumors dels grups alimentats amb dieta rica en oli de blat de moro (grups HCO i LF-HCO) presentaven tumors amb més grau de malignitat que els tumors del grup control (LF) i els dels grups alimentats amb una dieta rica en OOVE (HOO i LF-HOO).

L’anàlisi de l’expressió gènica va mostrar nivells d’expressió de gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa i la via de les pentoses fosfat més alts en els grups alimentats amb dietes hiperlipídiques en comparació el grup control. Entre els grups de dieta hiperlipídica, es van observar algunes diferències quant a l’expressió gènica d’enzims involucrats en la glicòlisi i en la glutaminòlisi (incrementats en el grup LF-HCO

Resultats

en comparació LF-HOO), i en les pentoses fosfat (incrementats en els grups d'oli d'oliva respecte blat de moro).

En relació amb els nivells d'expressió proteica van revelar diferències, especialment entre els grups de dieta hiperlipídica, en el metabolisme de la glucosa i dels nivells d'expressió d'UCP2, que van ser superiors en els grups alimentats amb dieta d'OOVE en comparació als grups de la dieta rica en oli de blat de moro. En concret, el grup alimentat amb OOVE des de la inducció (HOO) va mostrar un increment en l'expressió d'enzims de la glucòlisi (Glut1, PFKL), de les pentoses fosfat (G6PDH, PGD) i de l'activitat de la citrat sintasa (CS), mentre que el grup alimentat amb OOVE després de la inducció (LF-OOVE), va presentar un increment d'UCP2 i de l'activitat d'enzims involucrats en el cicle de Krebs (CS, IDH1 i 2).

D'altra banda, els estudis *in vitro* van mostrar resultats heterogenis i poc concloents amb relació a la modulació de proteïnes de vies metabòliques per efecte dels tractaments.

Aportacions més rellevants

- Les dietes hiperlipídiques tenen un efecte diferencial sobre la promoció i progressió de la carcinogènesi mamària, amb un influència clarament estimuladora en el cas de la dieta rica en PUFA n-6, i un efecte feble de la dieta rica en OOVE (tumors semblants als del grup control, malgrat haver administrat un excés de greixos)
- Les dietes hiperlipídiques modulen diferencialment l'expressió dels principals enzims, mostrant un increment del metabolisme de la glucosa i del mitocondrial per efecte de l'OOVE, el que suggereix un efecte específic del tipus de lípid consumit en les adaptacions metabòliques dels tumors experimentals.
- Els resultats de la caracterització metabòlica dels tumors no reflecteix el grau de malignitat tumoral (tumors menys agressius per l'OOVE), suggerint que el metabolisme, de forma aïllada, no resultaria un bon marcador de la malignitat cel·lular. Aquest fet posa de manifest la necessitat d'estudiar el metabolisme en el context molecular del tumor i la seva interrelació amb altres vies.

Resultats

- Els efectes observats en el metabolisme també depenen del moment de la intervenció dietètica, suggerint que la plasticitat metabòlica depèn de l'estat de la glàndula mamària en el moment de la inducció.



RESEARCH PAPER

A high extra-virgin olive oil diet induces changes in metabolic pathways of experimental mammary tumors

Maite Garcia-Guasch^a, Lourdes Navarro^a, Vanessa Rivero^a, Irmgard Costa^b, Eduard Escrich^a, Raquel Moral^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain
^b Department of Pathology, Corporació Parc Taulí-UDIAT, Sabadell, Barcelona, Spain

Received 31 July 2020; received in revised form 22 February 2021; accepted 6 July 2021

Abstract

Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide, and environmental factors, especially diet, have a role in the etiology of this disease. This work aimed to investigate the influence of high fat diets (rich in corn oil or extra virgin olive oil -EVOO-) and the timing of dietary intervention (from weaning or after induction) on tumor metabolism in a seven,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)-induced breast cancer model in rat. The effects of lipids (oils and fatty acids) have also been investigated in MCF-7 cells. The results have confirmed different effects on tumor progression depending on the type of lipid. Molecular analysis at mRNA, protein and activity level of enzymes of the main metabolic pathways have also shown differences among groups. Thus, the animals fed with the EVOO-enriched diet developed tumors with less degree of clinical and morphological malignancy and showed modified glucose and mitochondrial metabolism when compared to the animals fed with the corn oil-enriched diet. Paradoxically, no clear influence on lipid metabolism by the high fat diets was observed. Considering previous studies on proliferation and apoptosis in the same samples, the results suggest that metabolic changes have a role in the molecular context that results in the modulation of different signaling pathways. Moreover, metabolic characteristics, without the context of other pathways, may not reflect tumor malignancy. The time of dietary intervention plays also a role, suggesting the importance of metabolic plasticity and the relation with mammary gland status when the tumor is induced.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Keywords: Dietary lipids; Extra virgin olive oil; Breast cancer; Metabolism; Carcinogenesis; Glucose metabolism.

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide with high incidence (24.2%), prevalence (30.1%) and mortality (15%) rates [1]. This disease is a multifactorial neoplastic process in which genetic, epigenetic and endocrine factors are involved. Moreover, the environment also has a role in its etiology, being diet one of the most important factors [2]. In this sense, the Mediterranean diet is known as a healthy eating pattern associated with an improvement in health status and with a protective effect in the development of chronic diseases, including breast cancer [3,4,5]. This diet is characterized by high consumption of vegetal products resulting in high intake of monounsaturated fat, complex

carbohydrates, fiber, antioxidant substances, polyphenols and other micronutrients, fish, and olive oil as the principal source of fat [6].

Some epidemiological [2,4,5] and especially experimental studies have reported an influence of dietary lipids on breast cancer risk that depends on the type and the quantity of fat, and the timing of dietary intervention [7]. In general, saturated fatty acids and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) show a positive association with breast cancer risk, whereas n-3 PUFA, as well as the ratio n-3/n-6 PUFA, decrease such risk [8,9,10]. Concerning monounsaturated fatty acids (MUFA), epidemiological evidence remains unclear [10] while experimental studies have reported from a weak-promoting to a protective effect on mammary carcinogenesis [7,11,12]. Several mechanisms underlying such

Abbreviations: DMBA, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene; EVOO, extra-virgin olive oil; FA, fatty acids; HCO, high corn oil; HOO, high extra-virgin olive oil; LF, low-fat; MUFA, monounsaturated fatty acids; PPP, pentose phosphate pathway; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TCA, tricarboxylic acid.

* Corresponding author at: Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Physiology Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-581-13-41.

E-mail addresses: maria.teresa.garcia.guasch@uab.cat (M. Garcia-Guasch), Lourdes.Navarro@uab.cat (L. Navarro), Vanessa.Rivero@uab.cat (V. Rivero), icosta@tauli.cat (I. Costa), Eduard.Esrich@uab.cat (E. Escrich), Raquel.Moral@uab.cat (R. Moral).

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108833>

0955-2863/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

effects of lipids on breast cancer have been investigated [8]. We have previously reported that dietary lipids influence clinical and morphological features of experimental mammary tumors through different complex molecular mechanisms, including modifications in expression profiles of metabolism genes [7].

Cancer cells accumulate alterations in the main metabolic pathways that sustain elevated rates of proliferation. Such metabolic reprogramming is considered a cancer hallmark [13]. The first metabolic alteration in cancer described was the Warburg Effect, a shift of glucose metabolism to its fermentation into lactate in aerobic conditions. This effect is thought to confer an advantage by producing more building blocks for cell growth and assuring NADPH production for the antioxidant defense [14,15]. Another important metabolic change affects glutamine availability, a key nitrogen and carbon supplier in several reactions [16]. Tumor cells also present increased lipid synthesis which is closely coupled to glucose metabolism and may balance lipogenesis, lipid uptake and lipolysis to maintain lipid homeostasis [17].

In previous works, we have reported different effects of high fat diets on mammary carcinogenesis. A diet high in corn oil had a clear promoting effect while a diet high in extra virgin olive oil (EVOO) had a weak influence [7,11,12]. Extra virgin olive oil and seed oils composition differ on their fatty acid profile and the minor compounds. EVOO is rich in MUFA (oleic acid represents 60–85% of total fatty acids, depending on the oil variety). Moreover, EVOO is rich in minor bioactive compounds (more than 230 have been identified), including polyphenols such as hydroxytyrosol, secoiridoids or flavonoids. Corn oil is rich in n-6 PUFA (50–60% of total fatty acids) and contains some minor compounds such as sterols and tocopherols. The differential effects that high corn oil and high EVOO diets exert on mammary carcinogenesis could be mediated, at least in part, by affecting the expression of different genes involved in proliferation, apoptosis and metabolism. Thus, this work aims to investigate the influence of such diets on tumor metabolism in the rat model of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced breast cancer. To this end, we analyzed the main metabolic pathways to gain insight into the role of dietary lipids in breast cancer development and to provide scientific knowledge to establish healthy dietary advice for the population.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

Animals received humane care under a protocol approved following the legislation applicable in this country. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Lab, L'Arbresle Cedex, France) at 23 days of age were distributed in five groups depending on the diet administered and the timing of dietary intervention (n=20 each group), and were maintained under standard conditions (Fig. 1). Animals were fed with a control low fat diet (LF), with a high corn oil diet from weaning (HCO) or after induction (LF-HCO), or with a high extra virgin olive oil diet from weaning (HOO) or after induction (LF-HOO). Mammary tumors were induced by oral gavage with a single dose (5 mg) of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 53 days of age. Rats were euthanized at 236–256 days by decapitation. Tumors were removed, the three diameters were measured, and volume was calculated (V = 4/3π 4/3π [d1/2] x [d2/2] x [d3/2]). A portion of each tumor was fixed in 4% formalin for anatomopathological analysis, and the rest was flash-frozen and stored at -80°C for molecular analysis.

The morphological degree of tumor malignancy was characterized by applying the Scarf-Bloom-Richardson grading method (SBR3, scoring 1–3), and the modified method adapted to rat mammary adenocarcinomas (SBR11, scoring 3–11) that we have previously described [18]. The highest categories indicated the most morphologically aggressive tumors.

2.2. Diets

Three semi-synthetic diets were designed, as described before [19,20,21]: a low fat diet (LF, 3% corn oil w/w), a high corn oil diet (HCO, 20% corn oil) and a high olive oil diet (HOO, 3% corn oil+17% EVOO). Carbohydrates in the form of dextrose

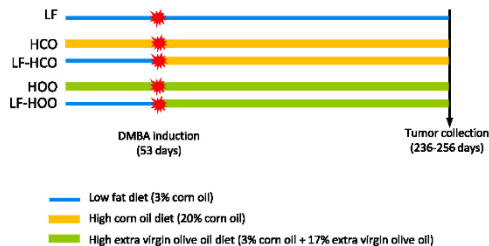


Fig. 1. Experimental design.

Female Sprague-Dawley rats were fed the low fat control diet (LF), the high corn oil diet from weaning (HCO) or from induction (LF-HCO), and the high extra-virgin olive oil diet from weaning (HOO) or from induction (LF-HOO), n = 20 animals / group. Animals were induced with 5 mg of 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) at 53 days of age and euthanized at 236–256 days.

were 67.9% w/w in LF and 45.9% in both high fat diets. The diets also contained protein in the form of casein (18% w/w in the LF diet and 23% in the high fat diets) and 5% w/w cellulose, 5.9% w/w salt mixture and 0.24% w/w vitamin mixture. In order to maintain the normal lipidic metabolism, they were supplemented with methionine (0.51% w/w in LF and 0.66% in the high fat diets), choline (1800 mg/kg diet) and folic acid (5 mg/kg diet). The characteristics of lipids, minor compounds and energy composition of diets are given in Supplemental Table 1. Diets were prepared weekly and stored under nitrogen in the dark at 4°C.

2.3. RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA from tumor samples was isolated using the RNeasy Extraction Kit (QiaGen, Hilden, Germany) and quantified with Nanodrop 1,000 (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Two micrograms of total RNA were reverse-transcribed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). For the real-time PCR, 25 ng of cDNA were amplified with the TaqMan methodology in the iCycler iQ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Specific Gene TaqMan Assays for glut1, hk2, pfkf, pfkm, g6pdh, pgd, gls and Hprt as the housekeeping control gene were obtained from Applied Biosystems. PCRs were performed at 10min at 95°C followed by 15s at 95°C and 60s at 60°C for 40 cycles. Cycle thresholds (Ct) for each sample were obtained and 2^{-ΔCt} calculated.

2.4. Protein extraction

Total protein was extracted homogenizing tumor samples in an extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl2, 50 μM NaF, 100 μM Na3VO4, 10 μl/ml protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), 10 mM β-mercaptoethanol and 1% Triton X-100). For cytosolic, mitochondrial and membrane extracts samples were fractioned by cold centrifugations at 105,000g for one hour following standard protocols. Protein quantification was determined by Lowry method using the commercial DC Protein Assay Kit (Bio-Rad).

2.5. Western blot

The different protein extracts (15–20 ug) were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on an acrylamide gel (Mini-Protean TGX Stain Free Gels, Bio-Rad) and transferred to a PVDF membrane with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5%BSA TBS-Tween 0.1% or 5% skimmed milk TBS-Tween 0.1% for 1h at room temperature and incubated with the specific primary antibody overnight at +4°C. Primary antibodies used were anti-Glut1 (1:1,000), anti-PFKL (1:500), anti-ALDOA (1:1,000), anti-G6PDH (1:3,000), anti-PGD (1:5,000), anti-ASCT2 (1:3,000), anti-ACC (1:1,000), anti-pACC (1:3,000), anti-FASN (1:20,000), anti-SCD (1:2,000), anti-AMPK (1:2,000), anti-pAMPK (1:2,000) from cell signaling; anti-LDHA (1:30,000), anti-CPT1a (1:1,000), anti-ACDL (1:3,000), anti-UCP2 (1:5,000), anti-ACLY (1:5,000) from abcam; and anti-GLS (1:1,000) from ThermoFisher scientific. After incubation with the secondary antibody (anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat, Sigma-Aldrich) for 1h at room temperature, the membranes were incubated with Luminata Forte Western HRP Substrate (EMD Millipore) luminogen for 3–5 minutes. Proteins were visualized using the Chemidoc XRS+ hardware associated with Image Lab Software 5.1-Beta (Bio-Rad). Densitometric values were normalized with the total protein loaded [22] and related to an internal control sample loaded in duplicates in all blots [7].

Table 1
Clinical and anatomopathological characteristics of tumors

	LF	HCO	LF-HCO	HOO	LF-HOO
Carcinogenesis parameters (clinical malignancy)					
Tumor-bearing animals (%)	80 ^a	100 ^b	100 ^b	75 ^a	85 ^{a,b}
Tumor yield (total number of tumors)	47 ^a	100 ^b	87 ^{b,c}	58 ^{a,c}	82 ^{b,c}
Anatomopathological degree (morphological malignancy)					
n	47	98	84	50	81
SBR3, number of tumors 1/2/3	27/14/6 ^a	23/43/32 ^{b,c}	17/29/38 ^b	19/22/9 ^a	34/28/19 ^{a,c}
degree 1 (%)	57.4	23.4	20.3	38.0	42.0
degree 2 (%)	29.8	43.9	34.5	44.0	34.6
degree 3 (%)	12.8	32.7	45.2	18.0	23.4
adapted SBR11, median	5 ^a	7 ^{b,c}	8 ^c	7 ^{a,b,c}	6.5 ^{a,b}
Characteristics of tumors included in the molecular study					
n	14	26	24	21	25
SBR3, number of tumors 1/2/3	10/3/1 ^a	8/10/8 ^{b,c}	3/9/12 ^c	8/11/2 ^{a,b,c}	7/14/4 ^b
degree 1 (%)	71.4	30.8	12.5	38.1	28.0
degree 2 (%)	21.4	38.4	37.5	52.4	56.0
degree 3 (%)	7.2	30.8	50.0	9.5	16.0
adapted SBR11, median	5 ^a	7.5 ^{b,c}	8.5 ^b	6 ^{a,c}	7 ^c
Tumor volume, median (cm3)	0.60 ^a	1.80 ^{b,c}	3.89 ^c	1.99 ^{a,b,c}	2.31 ^{a,b}

Values within a row with different superscript letters are significantly different ($P < .05$). Quantitative data (adapted SBR11, tumor volume): Mann-Whitney U test. Qualitative data (tumor-bearing animals, tumor yield, distribution of tumors according to SBR1, SBR2, SBR3): chi-squared test.

2.6. Enzymatic activity assays

For determination of citrate synthase and isocitrate dehydrogenase activity, we used the Citrate Synthase Activity Assay Kit (MAK193, Sigma Aldrich) and Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit (MAK062, Sigma Aldrich). Ten mg of tumor tissue were homogenized in 100µL of ice-cold extraction buffer, kept on ice for 10 minutes and centrifuged at 10,000xg for 5 minutes. Supernatants were transferred to fresh tubes and protein concentrations were determined. Activity assays were assessed according to the manufacturer's instructions. The enzymatic activities were determined with coupled enzymes reactions in which resultant products are proportional to activity and are measured spectrophotometrically at 412 nm.

2.7. Cell culture treatment

MCF-7 breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and grown in EMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.01 mg/mL of insulin. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂, and tested for mycoplasma periodically.

MCF-7 cells were seeded 48 hours prior to treatments in p100 plates with EMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.01 mg/mL of insulin. For fatty acid treatments, oleic or linoleic acid-albumin from bovine serum (Sigma Aldrich) were used at 0mM (control) or 1 mM concentration. All the solutions contained 0.1 mg/mL of BSA. For oils treatments, extra virgin olive oil (EVOO) or corn oil solutions were prepared at 0% (control) or 0.1% oil solubilized in DMSO (0.3%). The EMEM medium was supplemented with 5% FBS and 0.01 mg/mL of insulin. All treatments (fatty acid and oils) were carried out for 24h, 48h, 72h and 96h, and protein was extracted following the standard protein extraction protocols.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R Deducer. The statistical test was determined depending on the sample distribution (Shapiro – Wilk test) and the equality of variances (Levene's test). Quantitative parametrical data were analyzed with one-way ANOVA test (t-test equal variance). Non-parametrical data were analyzed with Kruskal Wallis test – wilcoxon method. The chi-squared test was used for the qualitative data (carcinogenesis parameters and distribution of mammary adenocarcinomas according to the degree of morphological malignancy). The level of significance was established at $P < .05$.

3. Results

3.1. Clinical and morphological malignancy of tumors are influenced by dietary lipids

Carcinogenesis parameters and the morphological degree of tumor aggressiveness are shown in Table 1. The groups fed the high corn oil diet had a higher incidence (percentage of tumor-bearing animals) and tumor yield (total number of tumors) than the control LF group. The HCO group had also higher incidence and tumor yield than the HOO group. Morphological degree of malignancy was also clearly higher in the groups fed the high corn oil diet (as shown by the percentage of tumors with high degree of SBR3, and the SBR11 median), especially in the LF-HCO group, whereas the groups fed the EVOO diet displayed intermediate values. Moreover, the subgroup of tumors used in the molecular analyses presented in this work also showed a higher degree of malignancy in the groups fed the high corn oil diet, especially in the LF-HCO one (significantly higher degree in comparison to LF and EVOO groups). Tumor volume was significantly higher in the high corn oil diet groups versus LF, and in LF-HCO versus LF-HOO.

3.2. Dietary lipids influence the mRNA expression of enzymes of the main metabolic pathways

The expression levels of metabolism-related genes were analyzed by RT-PCR and are shown in Fig. 2. In general, tumors from rats fed with the high fat diets showed an increase in mRNA expression of glucose uptake and glycolysis-related genes ($P < .01$, Fig. 2A) and pentose phosphate pathway (PPP) genes ($P < .001$, Fig. 2B) in comparison to tumors from the low fat-fed rats. Gene expression patterns also revealed differences due to the type of dietary lipid. Higher levels of hk2, pfkl and pfkm mRNA were observed in the LF-HCO group compared to the LF-HOO group, while g6pdh and pgd expression was increased in HOO versus HCO. We also observed differences related to the time of dietary intervention, with higher levels of glut1, hk2, pfkl and pgd genes

Resultats

4

M. García-Guasch, L. Navarro, V. Rivero et al./Journal of Nutritional Biochemistry 99 (2022) 108833

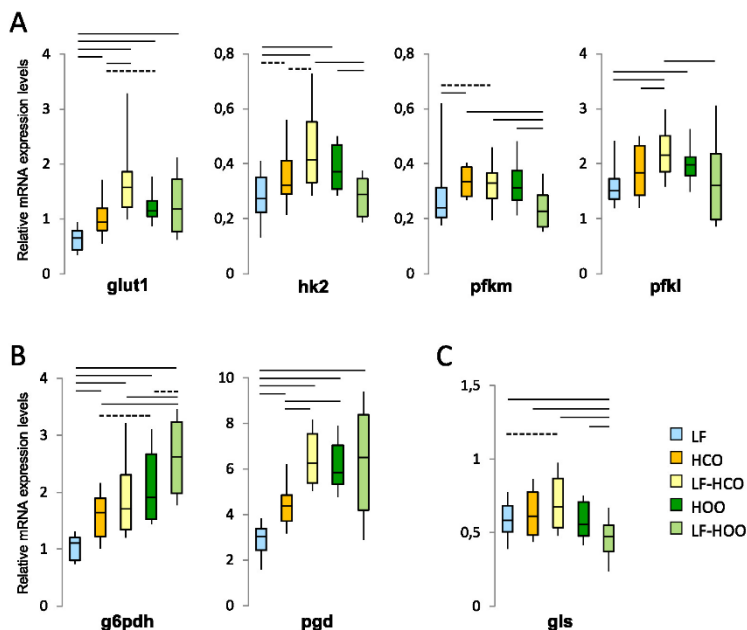


Fig. 2. Effect of diets on relative mRNA expression levels in mammary tumors. (A) Glucose transport and glycolysis-related genes. (B) Pentose phosphate pathway (PPP)-related genes. (C) Glutaminolysis-related gene. Boxplots (median, box 25 and 75 percentile, whisker 10 and 90 percentile). Solid lines connecting groups indicate statistically significant differences ($P < .05$), dashed lines indicate differences close to significance ($P < .1$). Kruskal Wallis test.

in LF-HCO compared to the group fed with the same diet from weaning (HCO). The mRNA levels of *hk2* and *pfkm* were also different between LF-HOO and HOO.

The study of glutaminolysis (Fig. 2C) revealed a decrease in *gls* mRNA in the LF-HOO group in comparison to all other experimental groups.

3.3. Dietary lipids have an effect on glucose metabolism, glutaminolysis and UCP2 protein expression but not on lipid metabolism-related enzymes

The enzymes of the main metabolic pathways were analyzed by western blot. Fig. 3 depicts the results of enzymes with a role in glucose transport and glycolysis (Fig. 3A), Warburg effect (Fig. 3B) and pentose phosphate pathway -PPP- (Fig. 3C). Changes in protein expression by the effect of dietary lipids were observed in the glucose transporter Glut 1, the glycolysis key enzyme PFKL, and the PPP enzymes G6PDH and PGD, with significant higher protein levels in the HOO group compared to the HCO group. The same trend was observed in PGD when comparing LF-HOO and LF-HCO groups.

In relation to lipid metabolism, the expression levels of the main proteins of fatty acid transport (FATP1), β -oxidation (CPT1a, ACADL) and de novo synthesis (ACLY, FASN, pACC and ACC, SCD) have been analyzed (Fig. 4A). In general, no differences have been found by the effect of the experimental diets.

For the study of glutaminolysis, we have analyzed the expression of the glutamine transporter ASCT2 and GLS enzyme (Fig. 4B). Expression of GLS was increased in HCO and HOO groups in comparison to the LF group.

Analysis of UCP2 was carried out in mitochondrial fractions (Fig. 4C). Results showed higher UCP2 protein levels in the LF-HOO group compared to the control and LF-HCO groups.

3.4. The diet rich in EVOO increases the activity of the main tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes

The results of the enzymatic activity of citrate synthase (CS) and isocitrate dehydrogenase isoenzymes (IDH1-3) are shown in Fig. 5. An increase in CS activity was obtained in both high EVOO diet groups in comparison to LF and high corn oil diet groups. IDH1/2 activity was significantly increased in the LF-HOO group. No differences were observed in IDH3 activity.

3.5. In vitro effects of dietary lipids

MCF-7 cells were treated with fatty acids (oleic acid and linoleic acid) and oils (EVOO and corn oil) for 24, 48, 72 and 96 hours. We analyzed the proteins found as differentially expressed in the DMBA-induced tumors (PFKL, GAPDH, PGD, UCP2) in the fatty acid- and oil-treated cells (supplemental Figure 1). Results showed heterogeneous data depending on lipid, concentration and time of exposures, with no clear trends along time (e.g. decreased PFKL by oleic acid at 48h but increased levels at 72h). Proteins related to lipid metabolism in oil-treated cells showed an effect of EVOO increasing the lipid transporter CD36 and decreasing FASN.

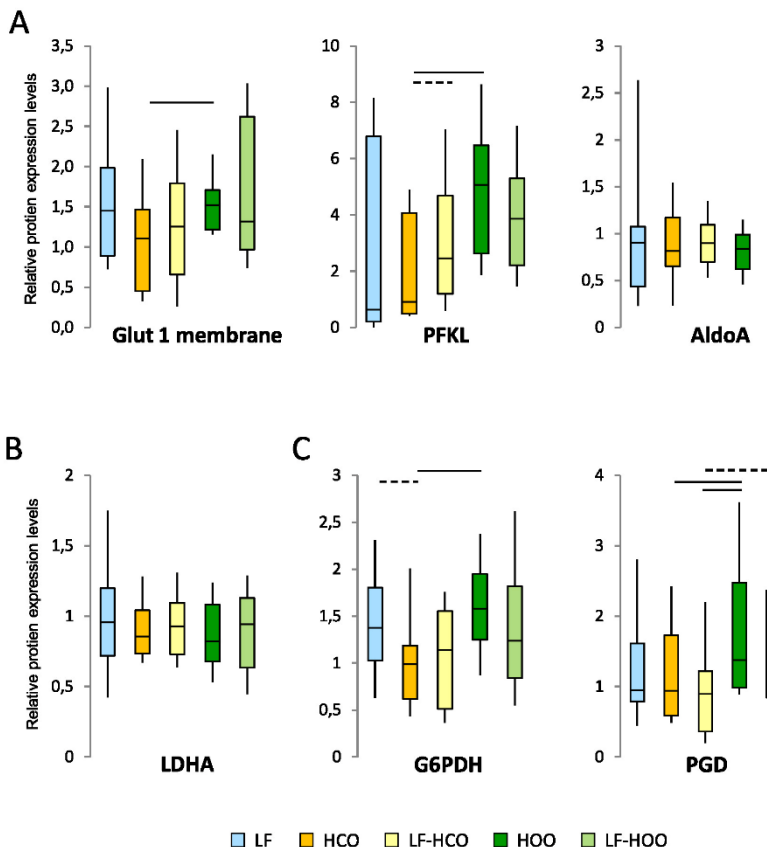


Fig. 3. Effect of diets on protein expression of main carbohydrate metabolic pathways in mammary tumors. (A) Glucose transport and glycolysis related-enzymes. (B) Warburg effect related-enzyme. (C) PPP related-enzymes. Boxplots (median, box 25 and 75 percentile, whisker 10 and 90 percentile). Solid lines connecting groups indicate statistically significant differences ($P < .05$), dashed lines indicate differences close to significance ($P < .1$). Kruskal Wallis test.

4. Discussion

In this work, we have studied the effect of high fat diets on metabolic enzymes (at mRNA, protein or activity level) in a carcinogen-induced breast cancer model, as a mechanism of the influence of diets on the progression of this disease. The results obtained show an effect of the high EVOO diet on glucose and oxidative metabolism and suggest a complex interconnection among metabolism and signaling pathways.

We have previously observed a strong promoter effect of the diet high in corn oil while a weak effect of the diet high in extra virgin olive oil, both in the clinical and morphological manifestation of mammary tumorigenesis [7]. In this study, we have also observed, in the subgroup of tumors where molecular analyses have been carried out, a differential effect of dietary lipids on the anatomopathological degree of malignancy. Tumor phenotype was characterized by both the Scarff–Bloom–Richardson (SBR) grading method (SBR3) and the one adapted to this rat model (SBR11) [23].

Results showed that tumors from rats fed with the high fat diets, especially from the high corn oil diet groups, displayed morphological characteristics of higher degree of malignancy. These results suggest that diets rich in fat may have an unspecific promoting effect on tumorigenesis, but for the same amount of fat there is a different specific effect depending on the main type of dietary lipid.

To get insight into the molecular mechanisms by which dietary lipids influence mammary carcinogenesis we previously performed transcriptomic analyses in tumors from the different experimental groups. Gene expression profiles and enriched functional categories indicated an effect of high fat diets on tumor metabolism, increasing the expression of glycolytic enzymes [7]. In this work, we have validated and extended those results, analyzing the effect of these two different high fat diets on key metabolism pathways. At mRNA level, we found changes in glycolysis and PPP enzymes in the high fat diet groups related to the control, but these differences were not significant at the protein level. Taking in mind that the

Resultats

6

M. García-Guasch, L. Navarro, V. Rivero et al./Journal of Nutritional Biochemistry 99 (2022) 108833

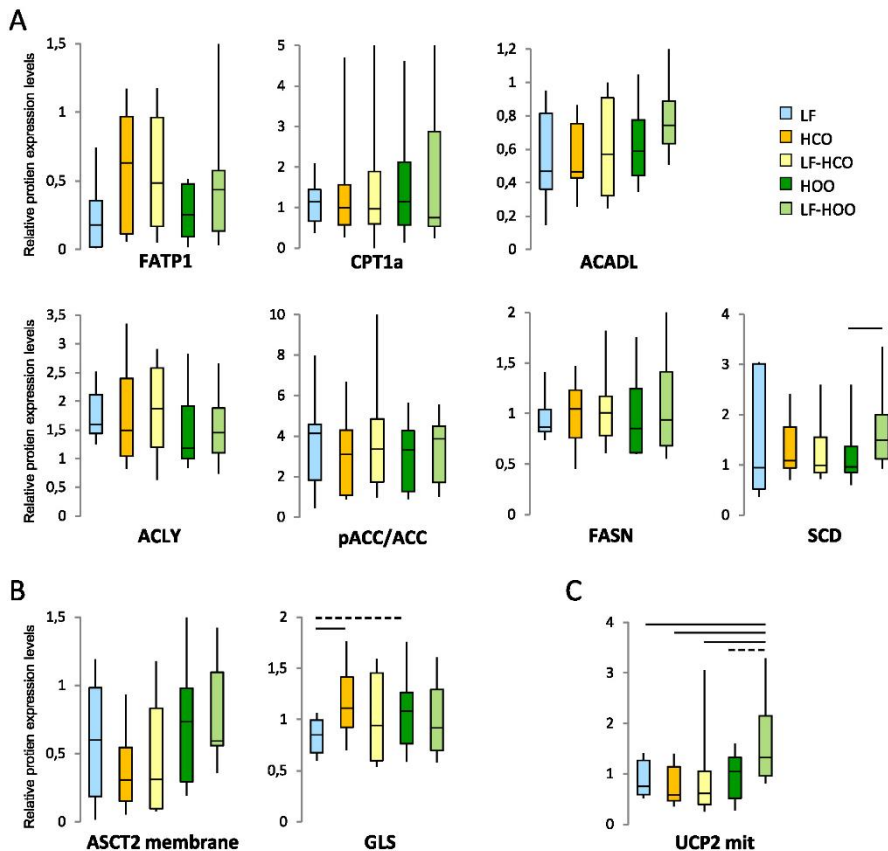


Fig. 4. Effect of diets on the expression of proteins related to lipid metabolism and glutaminolysis, and UCP2, in mammary tumors. (A) Lipid metabolism-related proteins. (B) Glutaminolysis-related proteins. (C) UCP2. Boxplots (median, box 25 and 75 percentile, whisker 10 and 90 percentile). Solid lines connecting groups indicate statistically significant differences ($P < .05$), dashed lines indicate differences close to significance ($P < .1$), Kruskal Wallis test.

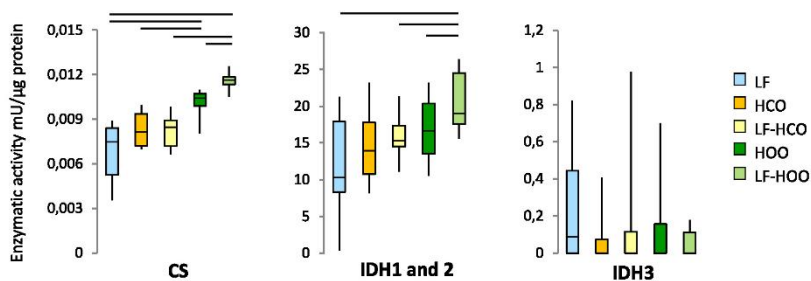


Fig. 5. Effect of diets on the activity of TCA cycle enzymes in mammary tumors. Enzymatic activity of citrate synthase (CS) and isocitrate dehydrogenase (IDH1, IDH2 and IDH3). Boxplots (median, box 25 and 75 percentile, whisker 10 and 90 percentile). Solid lines connecting groups indicate statistically significant differences ($P < .05$), dashed lines indicate differences close to significance ($P < .1$), Kruskal Wallis test.

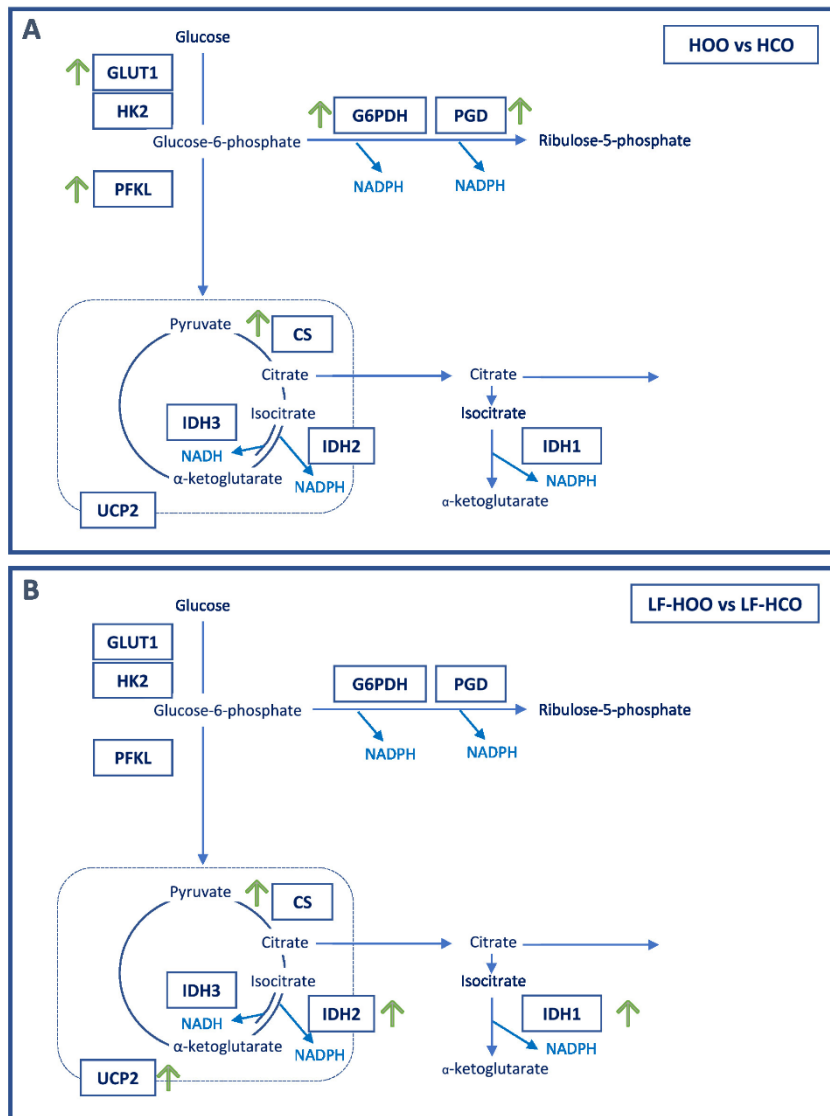


Fig. 6. Effects of the EVOO-rich diet on tumor metabolic pathways. (A) Effect of the administration of the EVOO-rich diet from weaning (comparison of HOO versus HCO). (B) Effect of the administration of the EVOO-rich diet after induction (comparison of LF-HOO versus LF-HCO). Green arrows represent significant higher levels of protein expression or enzymatic activity in the EVOO-rich diet group. Color version of figure is available online.

two high fat diets were isocaloric and that the type of oil was the only difference in their composition, we compared among high fat diet groups. As summed up in Fig. 6, our results suggest that the EVOO-enriched diet provided from weaning (observed in the HOO group) increased the mRNA and protein levels of enzymes with a

role in glucose uptake (Glut1), glycolysis (PFKL) and PPP (G6PDH, PGD) and increased the activity of the TCA cycle enzyme citrate synthase (CS). The group fed with the same diet after induction (LF-HOO) showed increased UCP2 protein levels and enzymatic activity of TCA cycle enzymes (CS and IDH).

No differences were found among groups when beta-oxidation, lipid synthesis or protein metabolism were studied. On the other hand, results obtained in MCF-7 cells treated with fatty acid or oils showed subtle and heterogeneous effects on the expression of metabolism proteins. Although the *in vitro* results do not show clear trends in many proteins, treatment with oils suggests changes such as in the lipid transporter CD36 or an increase in FASN (a key protein in fatty acid synthesis) by the effect of corn oil. Therefore, the tumor cells would respond to the exogenous source of lipids, as also suggested by the results of gene expression in tumors. This effect of lipids, although subtle, can be of great importance in the early stages of carcinogenesis. The chronic effect of the dietary intervention may be different in established tumors, such as those analyzed in this work, as many characteristics have already been selected and cannot be separated from the context of other cellular processes. Thus, although caution must be applied when extrapolating *in vitro* and *in vivo* effects, both n-6 PUFA and n-9 MUFA may affect tumor metabolism depending on dose or time variables.

There is evidence of the modulation of metabolism genes by dietary lipids in tissues like liver but reported data is less conclusive for tumor tissues [24]. Tumor cells undergo uncontrolled growth that has an impact on the regulation of metabolic pathways, either as a cause or as a consequence [14]. Nowadays, it is known that tumor cells use glycolysis, oxidative phosphorylation, or both, depending on the cell conditions. Moreover, cancer cells can shift their metabolic profile during tumorigenesis, tumor progression and metastasis to provide the requirements needed for cell growth and survival. Actually, metabolic changes and adaptation to maintain cell growth is considered a cancer hallmark [14,25]. Upregulation of glycolysis, PPP, the Warburg effect or IDH1/2 activity in malignant cells may be related to ROS detoxification and increased redox potential via NADPH generation [26,27]. Also, the function of UCP2 (an uncoupling protein family located in the mitochondrial membrane) is thought to be an adaptive response limiting ROS in breast cancer cells and avoiding ROS-mediated apoptosis [28]. Hence, according to reported data in the literature, the metabolic profiles we found in tumors from rats fed the EVOO-enriched diet (in comparison to those from the groups fed the high corn oil diet), may reflect an adaptive response to sustain cell growth or prevent cell death, but this is not in accordance with the clinical and morphological behavior of tumors that we have observed. Thus, anatomopathological and clinical parameters clearly showed a lower degree of aggressiveness in the groups fed the EVOO diet in comparison to the ones fed the high corn oil diet. This apparently contradictory fact may be explained by the interconnection of signaling pathways required for cell growth and survival. Therefore, the results obtained can be part of a complex and interconnected cell net. In this sense, we have previously reported that the EVOO-rich diet influences the molecular context in tumor cells resulting in increased apoptosis and decreased proliferation when compared to the effects of the high corn oil diet [29]. Moreover, in the same experimental model presented here we observed an increase in proliferation proteins by the effect of the high corn oil diet (activated p21Ras, phospho-AKT, phospho-Erk or Myc), while we found higher levels of pro-apoptotic proteins by the effect of the EVOO diet (FADD, Bid, Bax or p53 -unpublished results-).

We have also observed that the groups fed with the EVOO-enriched diet present differences in metabolic profiles depending on the time of the dietary intervention. The LF-HOO group showed higher activity of TCA cycle and UCP2 protein expression. We previously reported an increase in hepatic UCP2 mRNA by the effect of this high EVOO diet [30], in accordance with other authors reporting increased UCP2 by EVOO or oleic acid in different tissues [31]. Although UCP2 has been related to avoiding ROS-mediated apoptosis in cancer [32], our previous results showed higher levels of p53

and pro-apoptotic proteins expression in such LF-HOO group. The tumor suppressor p53 is involved in key cellular processes such as cell cycle arrest, cellular senescence, apoptosis or cell oxidative balance, in addition to the control of metabolism by limiting glycolysis and promoting mitochondrial respiration [33]. On the other hand, the same level of oxidative stress may have different consequences depending on the cell context, e.g. evading or inducing apoptosis depending on the activated signaling pathways [34]. Thus, our results suggest that UCP2 is increased in the LF-HOO group as cell protection from oxidative stress, concomitantly with an increase in apoptotic pathways that would lead to cell death, which would be consistent with the lower morphological malignancy of tumors in this group. Other studies have also reported an effect of EVOO components (polyphenols and oleic acids) on apoptosis in cancer [35]. In tongue squamous cell carcinomas, oleic acid treatment induced apoptosis and autophagy [32], and hydroxytyrosol regulated proliferation and apoptosis-related pathways in DMBA-induced mammary tumors [36].

Results less conclusive were obtained from the HOO group. This group showed an increase in glycolysis and PPP, which has been related to sustained cell growth and a decrease in apoptosis [37]. This metabolic profile favors NADPH generation which may lead to inhibit caspase activation [38]. Thus, an increase in NADPH could be a cause that apoptosis is not increased in this group fed with EVOO. On the other hand, the HOO group showed less activation of proliferation pathways when compared to HCO [29] as well as a lower clinical and anatomopathological degree of malignancy. Therefore, the metabolic profile is not a direct reflection of tumor malignancy since it is interconnected with the whole cell network. More studies are required to deep in and clarify the importance of cell metabolic profiles and its relation to tumor malignancy.

In summary, in this work we have studied the effect of dietary fats on breast cancer tumorigenesis pointing out the importance of the type of lipid. Thus, high fat diets lead to a more malignant phenotype when compared with a low fat diet, but the degree of malignancy is clearly associated with the type of fat. Tumors from animals fed with the EVOO-enriched diet showed a lower degree of malignancy and changes in metabolic pathways, in comparison to those from rats fed with the corn oil-enriched diet. The results obtained, together with previous studies in these same samples, suggest that these metabolic changes have a role in the molecular context that results in the modulation of different signaling pathways in the tumors from the animals fed with EVOO. Therefore, the metabolic characteristics, without the context of other pathways such as proliferation or apoptosis, may not reflect tumor malignancy. Moreover, we have also observed that the time of dietary intervention has a role in metabolic plasticity and that may be related to the status of the mammary gland when the tumor is induced. Future studies in metabolomics will be conducted to elucidate the effects of dietary lipids on the molecular basis and interconnection of different pathways. *In vitro* analysis with EVOO minor compounds will also get insight into the effect of that oil on tumor metabolism. In conclusion, our study provides new data on the link between dietary lipids and tumor biology, and highlights the importance of dietary habits from early life in the risk of this disease.

Author Contributions

Maitte Garcia-Guasch: Investigation, Methodology, Analysis, Visualization, Writing - Original Draft; Lourdes Navarro: Investigation; Vanessa Rivero: Investigation; Irmgard Costa: Methodology, Investigation; Eduard Escrich: Conceptualization, Methodology, Funding acquisition, Resources; Raquel Moral: Conceptualization, Supervision, Analysis, Writing - Review & Editing.

Declaration of Competing Interests

No conflicts of interest.

Funding

This work was supported by grants from “Plan Nacional de I+D+I” (AGL2006-07691); “Fundación Patrimonio Comunal Olivarero (FCO)” (FPCO2008-165.396; FPCO2013-CF611.084); “Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente” (AAO2008-165.471); “Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español (OIAOE)” (OIP2009-CD165.646), “Departaments de Salut i d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya” (GC2010-165.000), FPCO and OIAOE (FPCO-OP2016-CF614.087).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108833.

References

[1] IARC Global Cancer Observatory. GLOBOCAN; 2018. Available at <https://gco.iarc.fr>.

[2] Kotepui M. Diet and risk of breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2016;20:13–19. doi:10.5114/wo.2014.40560.

[3] Turati F, Caroli G, Bravi F, Ferraroni M, Serraino D, Montella M, et al. Mediterranean diet and breast cancer risk. *Nutrients* 2018;10:1–11. doi:10.3390/nu10030326.

[4] Li Y, Hu BQ, Wu XJ, Qi XW, Jiang J, Cui X, et al. Adherence to Mediterranean diet and the risk of breast cancer: A meta-analysis. *Transl Cancer Res* 2018;7:1290–7. doi:10.21037/tcr.2018.10.13.

[5] Buckland G, Travier N, Cottet V, González CA, Luján-Barroso L, Agudo A, et al. Adherence to the mediterranean diet and risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort study. *Int J Cancer* 2013;132:2918–27. doi:10.1002/ijc.27958.

[6] Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1402S–1406S. doi:10.1093/ajcn/61.6.1402S.

[7] Eschrich R, Costa I, Moreno M, Cubedo M, Vela E, Eschrich E, et al. A high-corn-oil diet strongly stimulates mammary carcinogenesis, while a high-extra-virgin-olive-oil diet has a weak effect, through changes in metabolism, immune system function and proliferation/apoptosis pathways. *J Nutr Biochem* 2019;64:218–27. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.11.001.

[8] Yang B, Ren XL, Fu YQ, Gao JL, Li D. Ratio of n-3/n-6 PUFAs and risk of breast cancer: A meta-analysis of 274135 adult females from 11 independent prospective studies. *BMC Cancer* 2014;14:1–14. doi:10.1186/1471-2407-14-105.

[9] Huerta-Yépez S, Tirado-Rodríguez AB, Hankinson O. Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2016;73:446–56. doi:10.1016/j.bmhmx.2016.11.001.

[10] Binukumar B, Mathew A. Dietary fat and risk of breast cancer. *World J Surg Oncol* 2005. doi:10.1186/1477-7819-3-45.

[11] Eschrich E, Solanas M, Moral R. Olive oil and other dietary lipids in cancer: experimental approaches. In: Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, editors. *Olive oil and health*. Oxford: CAB International; 2006. p. 317–74.

[12] Eschrich E, Solanas M, Moral R, Eschrich R. Modulatory Effects and Molecular Mechanisms of Olive Oil and Other Dietary Lipids in Breast Cancer. *Curr Pharm Des* 2011;17:813–30. doi:10.2174/138161211795428902.

[13] Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* 2012;21:297–308. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014.

[14] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* 2008;13:472–82. doi:10.1016/j.ccr.2008.05.005.

[15] Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 2016;41:287. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.004.

[16] Michalak KP, Mackowska-Kedziora A, Sobolewski B, Wozniak P. Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015. doi:10.1155/2015/964321.

[17] Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res* 2013;52:585–9. doi:10.1016/j.plipres.2013.08.005.

[18] Costa I, Solanas M, Eschrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:915–27. doi:10.5858/2002-126-0915-HCOMNL.

[19] Eschrich E, Solanas M, Segura R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I - Diet definition. *In Vivo* 1994;8:1099–105.

[20] Eschrich E, Solanas M, Ruiz De Villa M, Ribalta T, Muntane J, Segura R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *In Vivo* 1994;8:1107–11.

[21] Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menéndez JA, Colomer R, et al. Effects of a high olive oil diet on the clinical behaviour and histopathological features of rat DBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol* 2002;21:745–53. doi:10.3892/ijo.21.4.745.

[22] Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 2013;433:105–11. doi:10.1016/j.ab.2012.10.010.

[23] Moral R, Eschrich R, Solanas M, Vela E, Costa I, De Villa MCR, et al. 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;63:410–20. doi:10.1080/01635358.2011.535956.

[24] Jump DB. Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;41:41–78. doi:10.1080/10408360490278341.

[25] Bishal Paudel B, Quaranta V. Metabolic plasticity meets gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:3370–2. doi:10.1073/pnas.1900169116.

[26] Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett* 2019;17:4213–21. doi:10.3892/ol.2019.10112.

[27] Ghanbari Movahed Z, Rastegari-Pouyani M, Mohammadi M, Hossein, Mansouri K. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomed Pharmacother* 2019;112:108690. doi:10.1016/j.biopha.2019.108690.

[28] Vozza A, Parisi G, De Leonardis F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:960–5. doi:10.1073/pnas.1317400111.

[29] Solanas M, Grau L, Moral R, Vela E, Eschrich R, Eschrich E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis* 2010;31:871–9. doi:10.1093/carcin/bgp243.

[30] Moral R, Eschrich R, Solanas M, Vela E, Ruiz de Villa MC, Eschrich E. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. *Eur J Nutr* 2016;55:1397–409. doi:10.1007/s00394-015-0958-2.

[31] Gonçalves-de-Albuquerque CF, Medeiros-de-Moraes IM, De Oliveira FMJ, Burth P, Bozza PT, Faria MVC, et al. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS One* 2016;11:1–18. doi:10.1371/journal.pone.0153607.

[32] Jiang L, Wang W, He Q, Wu Y, Lu Z, Sun J, et al. Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas. *Sci Rep* 2017;7:1–11. doi:10.1038/s41598-017-11842-5.

[33] Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurakawa M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016;327:43–87. doi:10.1016/bs.ircmb.2016.06.006.

[34] Redza-Dutordoir M, DA Averill-Bates. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:2977–92. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.

[35] Keating E, Martel F. Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Front Nutr* 2018;5. doi:10.3389/fnut.2018.00025.

[36] El-azem N, Pulido-Moran M, Ramirez-Tortosa CL, Quiles JL, Cara FE, Sanchez-Rovira P, et al. Modulation by hydroxytyrosol of oxidative stress and antioxidant activities of palmitate in breast cancer. *Eur J Nutr* 2019;58:1203–11. doi:10.1007/s00394-018-1638-9.

[37] Majors BS, Betenbaugh MJ, Chiang GC. Links between metabolism and apoptosis in mammalian cells: Applications for anti-apoptosis engineering. *Metab Eng* 2007;9:317–26. doi:10.1016/j.ymben.2007.05.003.

[38] Yi CH, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Integration of apoptosis and metabolism. *Coling Spring Harb Symp Quant Biol* 2011;76:375–87. doi:10.1101/sqb.2011.76.010777.

Resultats

Resultats no publicats

Estudi de la influència de les dietes hiperlipídiques en el metaboloma dels tumors mamaris induïts experimentalment.

Materials i mètodes

Animals i disseny experimental

En aquest treball s'han utilitzat tumors obtinguts en el model de carcinogènesi mamària induïda en rata femella Sprague-Dawley amb 7,12-dimetilbenzantracè (DMBA). Els animals van arribar als 23 dies d'edat i es van separar en cinc grups (n=20 cada grup) depenent de la dieta administrada i el moment de la intervenció dietètica (veure Annex 1). Les rates van ser alimentades amb una dieta control baixa en greixos (*low fat*, LF), amb una dieta rica en oli de blat de moro des del deslletament (*high corn oil*, HCO) o després de la inducció (LF-HCO), o amb una dieta rica en OOVE des del deslletament (*high olive oil*, HOO) o després de la inducció (LF-HOO) (veure Annex 2). La inducció dels tumors es va realitzar per instil·lació bucogàstrica amb 5 mg de DMBA als 53 dies d'edat. Les rates van ser sacrificades als 236-256 dies i es van recollir els tumors per a l'anàlisi molecular.

Extracció dels metabòlits i preparació per l'anàlisi RMN

Els metabòlits es van extreure del teixit homogenat seguint el protocol prèviament descrit¹⁹⁰. Breument, es van homogenar 50 mg de teixit en tampó fosfat (100 mM, pH 7,4) i es van extreure els metabòlits amb una barreja de metanol:cloroform:aigua (1:1:0,25). Les mostres es van mantenir en gel durant 20 minuts i es van centrifugar a 10.000xg durant 15 minuts a 4°C. Després de la centrifugació es van recollir les fases aquosa i orgànica, que van ser assecades al buit o congelades en nitrogen líquid, respectivament. Les mostres van ser emmagatzemades a -80°C fins a la seva utilització.

Per a l'estudi de ressonància magnètica nuclear (RMN), els extractes aquosos es van reconstituir en 600 µL de tampó fosfat deuterat (PBS 100 mM, pH 7,4) amb 0,1 mM d'àcid propanoic 3-(trimetilsilil) (TSP-d4), i les fases orgàniques es van reconstituir en 600 µL de cloroform deuterat amb 0,03% de tetrametilsilà (TMS). Per a l'anàlisi, es van transferir 550 µL de cada mostra a un tub de RMN.

Resultats

Adquisició de dades

Els espectres de RMN es van adquirir a 298 K en un espectròmetre RMN Bruker Avance III HD 500 (Universitat d'Aveiro, xarxa portuguesa de RMN) que funcionava a 500,13 MHz per a l'observació d' ^1H i equipat amb una sonda TXI de 5 mm. Els espectres estàndard 1D ^1H (programes de pols de Bruker "noesypr1d" per a extractes aquosos i "zg" per a extractes orgànics) es van registrar amb una amplada espectral de 7002,8 Hz, 32 k punts de dades, un temps de relaxació de 2 s i 512 exploracions. Els espectres de correlació total 2D ^1H - ^1H (TOCSY) i els espectres resolts en J també es van registrar per a mostres seleccionades per ajudar a l'assignació espectral. El processament dels espectres es va realitzar mitjançant Topspin 4.0.6 i va incloure la fase manual, la correcció de la línia de base i la calibració del senyal mitjançant el senyal TSP/TMS (0 ppm). L'assignació del senyal es va basar en la concordança de la informació espectral 1D i 2D amb els espectres de referència disponibles a la base de dades Bruker BBIorefcode, així com a Chenomx 9.0 (Edmonton, AB, Canadà) i la biblioteca de referència composta HMDB ¹⁹¹.

Anàlisi multivariada i integració d'espectres de RMN

Els espectres es van normalitzar per àrea total i les matrius de dades es van escalar a la variància unitària (UV) donant la mateixa variància a totes les variables. L'anàlisi de components principals (PCA) i l'anàlisi discriminant de mínims quadrats parcials (PLS-DA) es van aplicar a les dades utilitzant el Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Els resultats es van representar com a diagrames de dispersió i es va utilitzar la variància explicada validada encreuament (Q^2) per avaluar la robustesa de la discriminació del grup PLS-DA.

Per proporcionar una mesura quantitativa de les variacions metabòliques, els senyals seleccionats es van integrar mitjançant Amix-Viewer 3.9.15 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanya) i es van normalitzar per àrea total. Els *loading profiles* i els *Heatmaps* es van generar mitjançant la versió del programari R 4.1.3 (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Àustria. URL <http://www.R-project.org/>).

Resultats

Resultats

Perfil metabòlic intracel·lular

Es va estudiar la influència de les dietes hiperlipídiques en el perfil metabòlic intracel·lular dels tumors del model experimental *in vivo* mitjançant l'anàlisi multivariada dels espectres obtinguts de l'anàlisi d'RMN ^1H .

Pel que fa a l'efecte de les dietes hiperlipídiques administrades en el moment del deslletament (grups HCO i HOO), l'Anàlisi de Components Principals (PCA) no va mostrar cap separació entre grups ni respecte al control, tal com es mostra a la Figura 11A. Els mateixos resultats (Figura 11B) es van obtenir quan es van analitzar els grups que havien rebut les dietes hiperlipídiques en el moment després de la inducció (LF-HCO i LF-HOO).

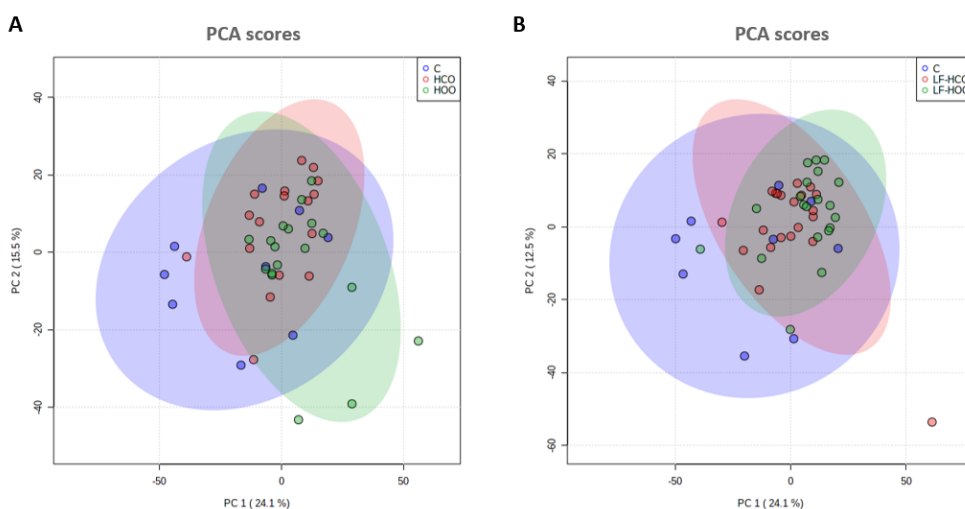


Figura 11. Diagrama de dispersió obtingut per PCA de la fracció aquosa dels tumors. (A) grups HCO i HOO respecte el control i (B) grups LF-HCO i LF-HOO respecte el control

Composició lipídica

La primera avaluació de l'efecte de les dietes hiperlipídiques en la composició lipídica del tumor es va realitzar aplicant l'anàlisi multivariada als conjunts de dades obtingudes dels espectres de cada tumor. La Figura 12A mostra el diagrama de dispersió obtingut per PCA a l'analitzar els grups que van rebre la dieta des del moment del deslletament (HCO i HOO) en comparació amb el control i la Figura 12B, els grups que la van rebre les dietes hiperlipídiques després de la inducció amb el carcinogen (LF-HCO i LF-HOO). Ambdues figures mostren una separació al llarg de PC2 (7,6%

Resultats

variància) i PC3 (5,4% variància) entre els grups amb una dieta rica en oli de blat de moro (HCO i LF-HCO) respecte als grups amb una dieta rica en oli d'oliva (HOO i LF-HOO) i grup control, que es troben agrupats. Aquests resultats suggereixen que la composició lipídica dels tumors que han rebut una dieta control (LF) i una dieta rica en oli d'oliva (HOO i LF-HOO) és més semblant entre elles i es diferencia dels grups que han rebut una dieta rica en oli de blat de moro (HCO i LF-HCO).

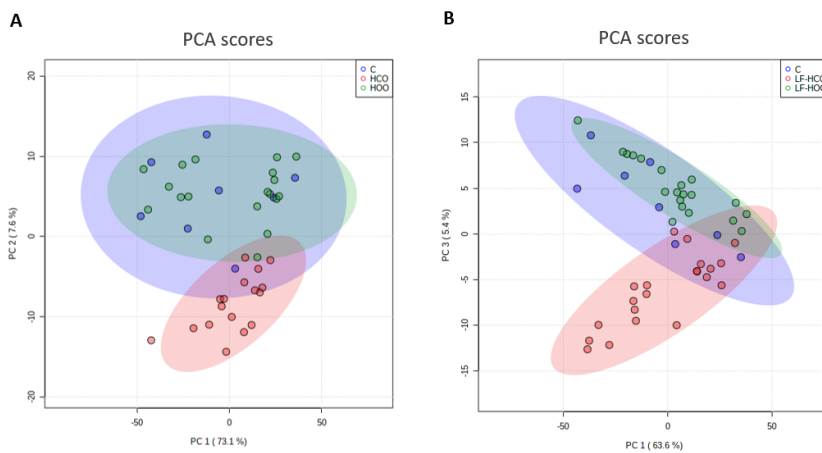


Figura 12. Diagrama de dispersió obtingut per PCA de la fracció lipídica dels tumors. (A) grups HCO i HOO respecte el control i (B) grups LF-HCO i LF-HOO respecte el control.

Pel fet que les dues dietes són isocalòriques i el tipus d'oli és l'única diferència entre elles, es va realitzar la comparació entre grups en funció del tipus de dieta hiperlipídica. La Figura 13A representa els diagrames obtinguts per PCA (esquerra) en analitzar l'efecte de les dietes subministrades des del deslletament. Els dos grups es troben separats al llarg del PC 2 (8,2% variància), i la separació es va confirmar mitjançant el PLS-DA (dreta) amb un alt poder predictiu (Q^2 0,811). L'anàlisi en els grups que van rebre la dieta en el moment de la inducció del tumor (Figura 13C) va revelar separació per l'efecte de les dues dietes (LF-HCO i LF-HOO) al llarg del PC 3 (5,8% variància) en el PCA. Aquesta separació es va confirmar mitjançant PLS-DA i *ortho*PLS-DA (OPLS-DA) amb un bon poder predictiu (Q^2 0,7). Els corresponents perfils LV1 (LV1 *loadings*) il·lustrats en la Figura 13B i 13D mostren els metabòlits més rellevants en la separació entre els grups.

Resultats

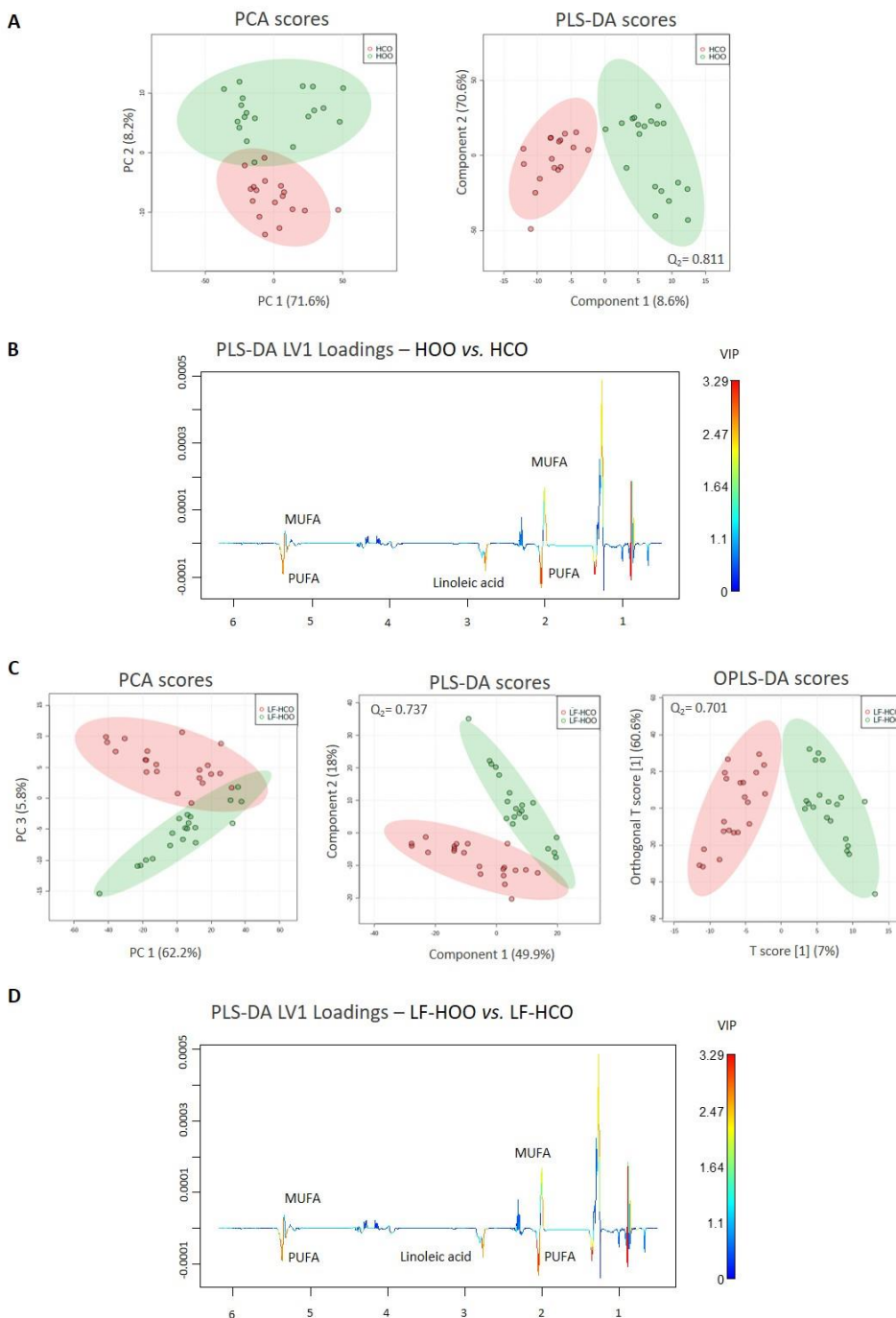


Figura 13. Anàlisi multivariada de la fracció lipídica dels tumors. (A) PCA (esquerra) i PLS-DA (dreta) pels grups HCO i HOO respecte el control i (B) els respectius LV1 Loadings. (C) PCA (esquerra) i PLS-DA (dreta) pels grups LF-HCO i LF-HOO respecte el control i (D) els respectius LV1 Loadings.

Resultats

L'anàlisi d'RMN ^1H dels extractes apolars de les cèl·lules va permetre identificar diverses classes de lípids i els seus nivells relatius. Per avaluar amb més detall la magnitud dels efectes en la composició lipídica dels tumors per part de les dietes hiperlipídiques, es van mesurar els nivells de metabòlits individuals mitjançant la integració dels espectres (Figura 14). Els resultats obtinguts no van revelar canvis en el contingut de colesterol, triglicèrids ni fosfolípids. En canvi, els tumors dels animals alimentats amb una dieta rica en oli de blat de moro (HCO i LF-HCO) van mostrar un increment en el total d'àcids grassos insaturats (Total UFA), de PUFA i d'àcid linoleïc i una disminució del total d'àcids grassos (Total FA) i de MUFA, en comparació al grup control i als grups alimentats amb una dieta rica en oli d'oliva (HOO i LF-HOO).

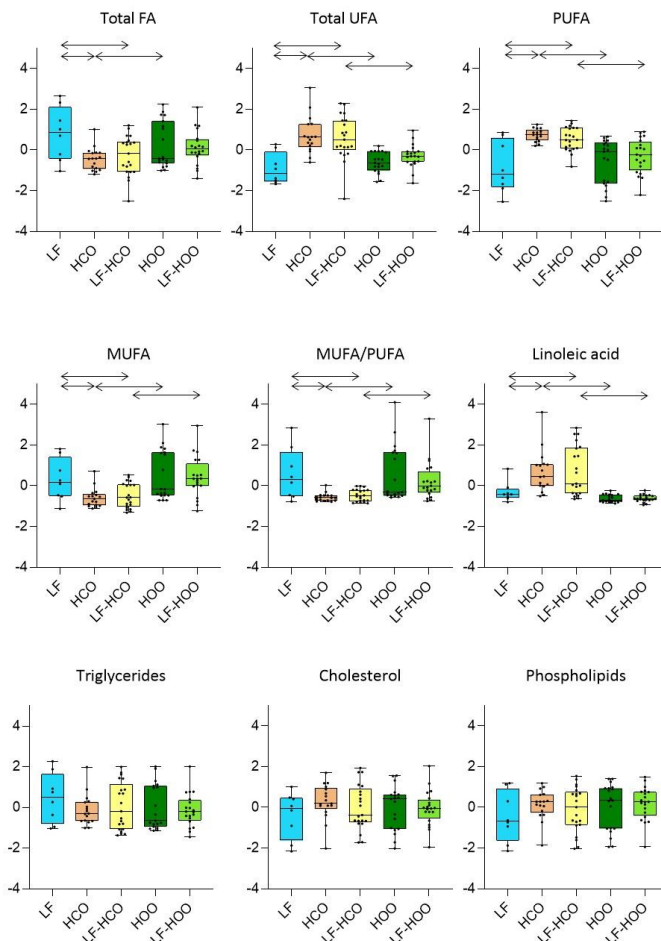


Figura 14. Nivells relatius de diferents classes de lípids de la composició lipídica dels tumors experimentals.

Resultats

Article científic 2

Extra-Virgin Olive Oil and Its Minor Compounds Influence Apoptosis in Experimental Mammary Tumors and Human Breast Cancer Cell Lines

Maite Garcia-Guasch 1,†, Mireia Medrano 1,†, Irmgard Costa 2, Elena Vela 1, Marta Grau 1, Eduard Escrich 1 and Raquel Moral 1,*

1 Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain.

2 Department of Pathology, Corporació Parc Taulí-UDIAT, 08208 Sabadell, Spain.

† These authors contributed equally to this work.

Plantejament i objectiu

L'apoptosi és una forma de mort cel·lular programada i la seva desregulació s'associa amb diferents malalties, entre elles el càncer. Els mecanismes que la regulen són complexos i involucren diferents vies. Les caspases són unes de les principals proteïnes implicades, ja que actuen com a iniciadores i executores, i es poden activar per diferents vies: la extrínseca, la intrínseca, la via del reticle endoplasmàtic i la via independent de caspases.

En el camp de la nutrició, diversos treballs estudien l'efecte d'alguns components bioactius sobre l'apoptosi com a possibles agents de prevenció i/o de tractament pel càncer. D'altra banda, pocs estudis han abordat l'efecte de la dieta sobre l'apoptosi tumoral *in vivo* que permetrien comprendre els mecanismes pels quals la dieta pot influir en el risc de càncer i desenvolupar estratègies de prevenció i tractament. L'objectiu d'aquest treball és estudiar l'efecte que tenen les dietes hiperlipídiques (una dieta rica en PUFA n-6 en comparació amb una dieta rica en MUFA) i el moment de la intervenció dietètica en els mecanismes de regulació de l'apoptosi en els tumors experimentals. A més, amb estudis *in vitro*, es pretén elucidar l'efecte dels diferents components de l'oli d'oliva (àcids grassos i polifenols) en la regulació de l'apoptosi en diferents línies cel·lulars de càncer de mama.

Metodologia

Aquest estudi s'ha realitzat en els tumors obtinguts en el model experimental de carcinogènesi mamària induïda químicament en la rata Sprague-Dawley, tal com s'ha

Resultats

comentat anteriorment (Annex 1). Els animals van ser alimentats amb dieta control (grup LF); dieta rica en PUFA n-6 des del deslletament (grup HCO) o després de la inducció (grup LF-HCO); o dieta rica en OOVE des del deslletament (grup HOO) o després de la inducció (grup LF-HOO, Annex 1 i 2). Quant a les anàlisis moleculars, s'han analitzat els nivells d'expressió de les principals proteïnes involucrades en la regulació de diferents vies apoptòtiques mitjançant western blot.

Per l'estudi *in vitro*, es van tractar les línies cel·lulars MDA-MB-231 i MCF-7 amb àcids grassos (àcid oleic o linoleic) i amb els principals polifenols de l'OOVE (hidroxitirosol, oleuropeïna i luteolina) per 24, 48 i 72 h. Es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular, determinació de l'apoptosi, anàlisi del potencial de membrana mitocondrial i anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux.

Es van analitzar els resultats obtinguts amb el programa R Deducer. En tots els casos, els nivells de significança estadística es van establir a $p < 0,05$.

Resultats

Aquest treball, com a continuació de l'estudi anterior, torna a posar en context el diferent efecte de les dietes hiperlipídiques sobre les característiques d'agressivitat clínica i anatomopatològica dels tumors. Pel que fa a l'estudi de l'efecte de les dietes hiperlipídiques en les principals vies apoptòtiques, s'ha observat un increment en vèries de les proteïnes implicades en diferents vies per efecte de la dieta rica en OOVE. Les proteïnes de la via extrínseca FADD, TNFR1 i caspasa-8 presentaven nivells superiors en els grups d'OOVE, especialment quan la dieta va ser subministrada després de la inducció (LF-HOO). Resultats similars es van obtenir en l'anàlisi de les proteïnes en la via intrínseca Bid, Bak i Bax, que també estaven augmentades en el grup LF-HOO. Respecte a l'apoptosi induïda per estrès del reticle endoplasmàtic, no es van trobar tendències clares en els nivells caspasa 12. Pel que fa a la caspasa-3 (punt de convergència de les vies extrínseca i intrínseca), els nivells del seu inhibidor XIAP va estar augmentat en el grup LF-HOO; malgrat això la seva forma activa (17kDa-cleaved caspasa 3) va mostrar una tendència estadística a estar incrementada. En el cas dels nivells d'expressió de les proteïnes EndoG i AIF, involucrades en la via independent de caspasa, i de p53, supressor de tumors, també es va observar increments de la seva expressió en el grup LF-HOO.

Resultats

L'estudi *in vitro* de l'efecte dels components de l'oli d'oliva en l'apoptosi va revelar un lleuger increment de la viabilitat quan les cèl·lules MDA-MB-231 van ser tractades amb els àcids grassos, acompanyat d'una lleugera disminució en l'apoptosi, mentre que no es va observar cap efecte d'aquests tractaments en les cèl·lules MCF-7. En canvi, el tractament de les dues línies cel·lulars amb els polifenols de l'OOVE, principalment hidroxitirosol, va revelar una disminució de la viabilitat cel·lular i un increment de l'apoptosi després de 48 h de tractament. Tot i això, no es van trobar diferències en el cicle cel·lular ni en el potencial de membrana mitocondrial després del tractament amb l'hidroxitirosol.

Aportacions més rellevants

- La dieta rica en oli d'oliva verge extra, especialment quan és subministrada després de la inducció (grup LF-HOO) promou l'increment de proteïnes proapoptòtiques en tumors experimentals induïts amb DMBA.
- L'efecte de les dietes sobre l'apoptosi seria un dels mecanismes moleculars dels seus efectes diferencials sobre el grau d'agressivitat tumoral (més malignitat en els grups de dieta rica en PUFA n-6 que en els de dieta rica en OOVE). En aquest sentit, en el grup HOO, que no va mostrar clarament augments de proteïnes proapoptòtiques, va presentar tumors més grans, però de menys malignitat anatomopatològica.
- El moment de l'administració de la dieta té un efecte en la regulació de l'apoptosi. L'administració després de la inducció va resultar, en el cas de la dieta rica en PUFA n-6, en els tumors de més grau d'agressivitat, i en el cas de la dieta rica en OOVE, en l'estimulació més gran de vies apoptòtiques, suggerint que en aquests grups l'estat de diferenciació de les glàndules les fa especialment sensibles a la influència del tipus de greix consumit.
- Els resultats *in vitro* mostren un efecte dels components minoritaris de l'OOVE en la viabilitat i en l'apoptosi de les cèl·lules, especialment de l'hidroxitirosol. Aquestes dades destaquen la importància de la composició específica dels aliments quant als seus potencials efectes sobre el risc, progressió o tractament del càncer de mama.



Article

Extra-Virgin Olive Oil and Its Minor Compounds Influence Apoptosis in Experimental Mammary Tumors and Human Breast Cancer Cell Lines

Maite Garcia-Guasch ^{1,†}, Mireia Medrano ^{1,†}, Irmgard Costa ², Elena Vela ¹, Marta Grau ¹, Eduard Escrich ¹ and Raquel Moral ^{1,*} 

¹ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; mariateresa.garcia.guasch@uab.cat (M.G.-G.); Mireia.Medrano@uab.cat (M.M.); Elena.Vela@uab.cat (E.V.); gr.mecm@uab.cat (M.G.); Eduard.Esrich@uab.cat (E.E.)

² Department of Pathology, Corporació Parc Taulí-UDIAT, 08208 Sabadell, Spain; icosta@tauli.cat

* Correspondence: Raquel.Moral@uab.cat

† These authors contributed equally to this work.

[check for updates](#)

Citation: Garcia-Guasch, M.; Medrano, M.; Costa, I.; Vela, E.; Grau, M.; Escrich, E.; Moral, R. Extra-Virgin Olive Oil and Its Minor Compounds Influence Apoptosis in Experimental Mammary Tumors and Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancers* **2022**, *14*, 905. <https://doi.org/10.3390/cancers14040905>

Academic Editors: Anupam Bishayee and Sanjay Gupta

Received: 16 September 2021

Accepted: 8 February 2022

Published: 11 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Breast cancer is a disease influenced by dietetic factors, such as the type and amount of lipids in a diet. In this work, we aimed to elucidate the different effects of two high-fat diets on the histopathological and molecular characteristics of mammary tumors in an experimental model. Animals fed with a diet high in extra-virgin olive oil (EVOO), compared to those fed with a diet high in seed oil, developed tumors with less aggressiveness and proliferation. Tumor molecular analyses of several cell death pathways also suggested an effect of EVOO in this process. In vitro experiments indicated the role of EVOO minor compounds on the effects of this oil. Obtaining insights into the influence and the mechanisms of action of dietary compounds are necessary to understand the relevance that dietetic habits from childhood may have on health and the risk of disease.

Abstract: Breast cancer is the most common malignancy among women worldwide. Modifiable factors such as nutrition have a role in its etiology. In experimental tumors, we have observed the differential influence of high-fat diets in metabolic pathways, suggesting a different balance in proliferation/apoptosis. In this work, we analyzed the effects of a diet high in n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and a diet high in extra-virgin olive oil (EVOO) on the histopathological features and different cell death pathways in the dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer model. The diet high in n-6 PUFA had a stimulating effect on the morphological aggressiveness of tumors and their proliferation, while no significant differences were found in groups fed the EVOO-enriched diet in comparison to a low-fat control group. The high-EVOO diet induced modifications in proteins involved in several cell death pathways. In vitro analysis in different human breast cancer cell lines showed an effect of EVOO minor compounds (especially hydroxytyrosol), but not of fatty acids, decreasing viability while increasing apoptosis. The results suggest an effect of dietary lipids on tumor molecular contexts that result in the modulation of different pathways, highlighting the importance of apoptosis in the interplay of survival processes and how dietary habits may have an impact on breast cancer risk.

Keywords: breast cancer; experimental mammary tumors; high-fat diets; apoptosis; cell death; olive oil; hydroxytyrosol; oleuropein; luteolin

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide, with high incidence, prevalence, and mortality rates [1]. This neoplasia has a multifactorial etiology, in which diet, as an environmental factor, has an important role. Epidemiological and especially

animal studies have reported an influence of diet and dietary fat on breast cancer [2,3]. In general, saturated fatty acids and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have shown a promoting effect on breast cancer, whereas n-3 PUFA, as well as the ratio of n-3/n-6 PUFA intake, showed an inverse association with breast cancer risk [3]. Regarding monounsaturated fatty acids (MUFA), evidence is still uncertain, and experimental studies have described effects ranging from a weak promoting effect to a protective effect on mammary carcinogenesis [4]. In this sense, the Mediterranean diet, of which a main source of fat is olive oil (rich in the n-9 MUFA oleic acid), is considered a healthy dietary pattern, with beneficial effects on the risks of cardiovascular diseases, obesity, and cancer. Epidemiological studies have demonstrated that adherence to this diet is associated to a reduction of overall and cancer mortality [5–7].

Obtaining insight into the effects that diet and nutrition have on cancer is inherently complex, as nutritional factors would exert a subtle and probably long-term influence in such a multifactorial disease. However, it is of great importance to determine these effects and the mechanisms involved, since exposure to these nutritional factors can occur from childhood and throughout life. Animal experimental models are essential in diet and cancer research, considering that nutrients and other dietary components may play a physiopathological role, interacting at many molecular and cellular levels. We have previously demonstrated in the 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA)-induced model of mammary cancer in rats a differential effect of high-fat diets, with a diet high in n-6 PUFA having a clear tumorigenesis-stimulating effect, while there was a weak influence of the isocaloric diet high in extra-virgin olive oil (EVOO; rich in MUFA and phenolic bioactive compounds) [4,8,9]. These effects were associated with several mechanisms, such as changes in growth and sexual maturation, hormonal status, mammary gland biology, and tumor molecular modifications, including transcriptomic changes modulating the function of cell death-related genes [4,8–13]. We have also recently reported that this high-EVOO diet, in comparison to the high n-6 PUFA diet, induced modifications in tumor metabolic characteristics suggesting a higher glucose uptake, glycolysis rate, and oxidative phosphorylation [13]. Although such metabolic features have been associated with tumor progression [14–16], these tumors displayed a less aggressive phenotype, highlighting that those metabolic characteristics without the context of other pathways, such as proliferation or apoptosis, may not reflect tumor malignancy.

Apoptosis is a programmed and ordered cell death process occurring in many physiological and pathological conditions. The mechanisms of programmed cell death are complex and driven by many pathways. Caspases are the main involved proteins, as they act as initiators and executioners, and can be activated by three pathways: the extrinsic, the intrinsic, and the endoplasmic reticulum pathway. Apoptosis can also be induced in a caspase-independent manner [17,18]. Reduced cell death, or its resistance, has a key role in carcinogenesis. Cancer cells can disrupt the balance of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins, reduce caspase function, and impair death receptor signaling in order to avoid programmed cell death and sustain uncontrolled growth [18]. Targeting apoptosis mechanisms is important in cancer treatment and the basis of many therapeutic approaches [19]. From the field of nutrition, several works are addressing the effect of some phytochemicals on apoptosis as potential prevention and treatment agents in cancer [20], although several factors, such as their bioavailability, are currently important limitations. On the other hand, few studies have addressed the effect of diet on tumor apoptosis *in vivo*. Understanding the mechanisms by which diet can influence cancer risk is needed to establish prevention and treatment strategies. Thus, the aim of this work is to elucidate the effect that the high-fat diets, high in a seed oil (rich in n-6 PUFA) or in extra-virgin olive oil (rich in oleic acid and bioactive compounds), and with different timings of dietary interventions, may have on the interplay among metabolism, proliferation, and apoptosis, with a special focus on the different apoptotic pathways (Figure S1). *In vitro* analysis in different human breast cancer cells with different fatty acids (oleic acid, linoleic acid) and minor compounds

(hydroxytyrosol, oleuropein, and luteolin) were also carried out to acquire insight into the molecular basis of the influence of EVOO on breast cancer.

2. Materials and Methods

1. Animals and Experimental Design

All animals received humane care under an institutionally approved experimental animal protocol, following the legislation applicable in this country. Female Sprague–Dawley rats (strain CrI: OFA (SD), $n = 100$) were obtained from Charles River Lab (L'Arbresle Cedex, France) at 23 days of age. Three semisynthetic diets were designed: the low-fat diet (LF; 3% corn oil $-w/w-$), the high corn oil diet (HCO; 20% corn oil) and the high extra-virgin olive oil diet (HEVOO; 3% corn oil + 17% EVOO). The definition, preparation, and suitability of the experimental diets were previously described in studies [8,21,22]. Animals were distributed in five groups depending on the diet and the timing of dietary intervention ($n = 20$ each group): the LF diet from weaning (LF group), the HCO diet from weaning (HCO group) or after induction (LF-HCO group), and the HEVOO diet from weaning (HEVOO group) or after induction (LF-HEVOO group). At 53 days of age, mammary tumors were induced by oral gavage with one single dose of 5 mg of DMBA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in corn oil (25 mg DMBA/kg body weight). From day 74 onwards, animals were monitored weekly for the appearance of mammary tumors. At 236–256 days of age, animals were euthanized by decapitation, selecting the rats that were in the diestrus phase of the estrous cycle, and between 10:00 h and 13:00 h to avoid circadian rhythm variability (Figure S2). Tumors were removed, a portion of each was fixed in 4% formalin for histopathological analysis, and the rest was flash-frozen and stored at -80°C for molecular analysis.

Tumor histopathology characterization was determined by applying the Scarff–Bloom–Richardson grading method (SBR3; scoring 1–3), and also the method adapted to rat mammary carcinomas that we have previously described (SBR11; scoring 3–11) [23], with the highest categories indicating the most aggressive tumors. SBR scores include differentiation pattern, nuclear pleomorphism, and mitotic index. Number of mitoses were determined in 10 high power fields (HPF) and classified into five categories [23]. Only confirmed mammary adenocarcinomas were included in this study.

2. Protein Extraction

Tumor samples were homogenized in an extraction buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.2, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , 50 μM NaF, 100 μM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 mM β -mercaptoethanol, and 1% Triton X-100) for total protein extraction. For fractionated extracts, samples were cold centrifugated at $105,000\times g$ for one hour to separate the soluble fraction (corresponding to cytosol) from the particulate fraction, which was further resuspended in extraction buffer with 0.1% Triton X-100 and centrifuged at $105,000\times g$ (supernatant corresponding to the membranous fraction containing all membranes). Mitochondrial extract was obtained from homogenized samples by centrifuging at $1500\times g$ to separate nuclei, followed by supernatant centrifuging at $10,000\times g$ to obtain precipitated mitochondria. Protein quantification was determined by Lowry's method using the commercial DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (cytosolic, mitochondrial, and membrane).

2.3. Western Blot

The different protein extracts (10–20 μg) were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on an acrylamide gel (7.5% or 12% Mini-Protean TGX Stain-Free Gels, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred to a PVDF membrane with Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% BSA or 5% skimmed milk in TBS-0.1% Tween for 1 h at room temperature and incubated with primary antibody overnight at $+4^{\circ}\text{C}$. The primary antibodies and dilutions used were: A1F (1:2000), APAF-1 (1:2000), Bak (1:2000),

Bax (1:2000), Caspase-3 (1:2000), Caspase-8 (1:1000), Caspase-9 (1:1000), Cytochrome C (1:500), p53 (1:500), TNFR1 (1:500), TRADD (1:1000), and XIAP (1:500) from Cell Signaling (Leiden, Holland); Bcl2 (1:1000), Bid (1:3000), EndoG (1:1000), FADD (1:1000), and Fas (1:500) from Santa Cruz Bioethnologies (Dallas, TX, USA); TRAF2 (1:3000) from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA); and Caspase-12 (1:2000) from Abcam (Cambridge, UK). Membranes were incubated with the secondary antibody (anti-mouse or anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated) for 1 h at room temperature and developed with Luminata Forte Western HRP Substrate (Merk Millipore, Burlington, MA, USA) luminogen for 3–5 min. Proteins bands were visualized using the Chemidoc XRS+ hardware associated with Image Lab Software 5.1-Beta (Bio-Rad). Densitometric values were normalized with the total protein loaded [24] and relativized to an internal control sample loaded in duplicates in all blots.

4. Cell Culture Treatment

For in vitro analyses, we used the MCF-7 cell line, representing the molecular subtype of human breast cancer Luminal A, and MDA-MB-231 cells, representing the triple-negative subtype. Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; LGC Standards, Middlesex, UK). MCF-7 cells were grown in EMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 0.01 mg/mL of insulin. MDA-MB-231 cells were grown in DMEM (Gibco) and supplemented with 10% FBS. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. The cell cultures were subjected to Mycoplasma screen tests periodically.

For fatty acid treatments, oleic acid- or linoleic acid-albumin from bovine serum (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were used at 0 µM (control), 1 µM, 10 µM, 100 µM, or 1 mM concentration. All the solutions contained 0.1 mg/mL of BSA (Sigma-Aldrich).

For treatments with EVOO minor compounds, we used hydroxytyrosol (PHL80152, Sigma Aldrich) at 0 µM (control), 100 µM, 250 µM, and 400 µM; oleuropein (12,247, Sigma Aldrich) at 0 µM (control), 10 µM, 30 µM, and 50 µM; and lutein (L9283, Sigma-Aldrich) at 0 µM (control), 5 µM, 10 µM, and 30 µM [25–27]. All the solutions contained 0.1% of DMSO.

5. Viability Assays

For analysis of cellular metabolic activity as an indicator of cell viability and proliferation, we used MTT colorimetric assay based on the reduction of thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) to formazan. Briefly, MCF-7 cells were seeded in 96-multiwell plates at 6×10^3 cells/well in 100 µL of complete EMEM (Gibco) medium with 5% FBS. MDA-MB-231 cells were seeded in 96-multiwell plates at 5×10^3 cells/well in 100 µL of complete DMEM (Gibco) medium with 5% FBS. After 24 h, the medium was replaced with fresh one containing the specific treatment and incubated for 24 to 72 h. MTT reagent was added to each well (10 µL/well of MTT solution at 5 mg/mL in PBS) and incubated 2 h at +37 °C. Then, formazan crystals were solubilized in 100 µL of 100% DMSO and absorbances were read at 570 nm. Relative cell viability was calculated as the ratio of absorbance of treated samples and control samples.

6. Determination of Apoptotic Cells by Flow Cytometry

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded 24 h before treatment in 12-multiwell plates at 2×10^5 cells/well in 1 mL of complete EMEM and DMEM (Gibco) medium, respectively, with 5% FBS. Cells were treated with the specific concentration of oleic acid, linoleic acid, hydroxytyrosol, oleuropein, or lutein for 24, 48, and 72 h. Cells were trypsinized, washed in PBS, and labelled with Annexin-V-Fluorescein and Propidium iodide (PI) using an Annexin-VFLUOS staining kit (Inmunostep, Salamanca, Spain) according to the manufacturer instructions. Then, data were acquired on a FACSCalibur flow cytometer at SCAC Facility, UAB.

7. Mitochondrial Membrane Potential Assay by JC-1 Staining

MCF-7 cells were seeded 48 h before treatment in 6-multiwell plates at 4×10^5 cells/well and treated for 24, 48, and 72 h with 0 or 400 μM of hydroxytyrosol (Sigma Aldrich). Briefly, cells were collected by trypsinization, stained with JC-1 dye (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and incubated at room temperature for 15 min at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 . Data were acquired on a FACSCalibur flow cytometer at SCAC Facility, UAB.

8. Cell Cycle Analysis

MCF-7 cells were seeded 48 h before treatment in 6-multiwell plates at 3×10^5 cells/well, 2.5×10^5 cells/well and 2×10^5 cells/well and treated for 24, 48, and 72 h respectively with 0 or 400 μM of hydroxytyrosol (Sigma-Aldrich). Cells were collected by trypsinization, fixed with 70% ethanol, and stored at -20°C . On the analysis day, cells were washed with PBS, labelled with 0.5 mL/ 1×10^6 cells of FxCycle PI/RNse staining solution (ThermoFisher Scientific), and incubated at room temperature for 30 min. Data were acquired on a FACSCalibur flow cytometer at SCAC Facility, UAB.

2.9. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using R Deducer. The statistical test to be used was determined depending on the distribution of each variable (Shapiro–Wilk test) and the equality of variances among groups (Levene’s test). Data from tumors usually do not follow a normal distribution, and the non-parametrical Kruskal–Wallis test—Wilcoxon method was used. Quantitative parametrical data were analyzed with one-way ANOVA test (*t*-test equal variance) and paired *t*-test. For qualitative data (distributions and percentages) the Pearson’s Chi-squared test was used. The level of significance was established at $p < 0.05$. For in vivo results, distribution of data is represented using box plots. Box indicates interquartiles (IQR; first quartile Q1, second quartile = median, and third quartile Q3); whiskers extend from maximum ($Q3 + 1.5 \times \text{IQR}$) to minimum ($Q1 - 1.5 \times \text{IQR}$); dots represent outliers; and cross indicates the mean value.

3. Results

1. The High-Corn Oil Diet Influenced the Manifestation of the Disease

Carcinogenesis parameters are shown in Table 1. The tumor latency period (days from induction to first palpable malignant tumor) was shorter in the HCO and LF-HCO groups, although differences did not reach statistical significance. On the other hand, the percentage of tumor-bearing animals and total number of tumors were higher in the groups fed the HCO diet in comparison to the LF and HEVOO groups. Tumor multiplicity (mean number of tumors per animal) was also increased in the HCO group in comparison to the LF group.

Table 1. Effect of high-fat diets on DMBA-induced tumorigenesis in rats.

Parameter	LF	HCO	LF-HCO	HEVOO	LF-HEVOO
Latency period (days, mean \pm SE)	98.6 \pm 11.9	81.8 \pm 9.9	76.4 \pm 9.3	86.4 \pm 10.3	94.8 \pm 6.8
Tumor incidence (%) (Tumor-bearing rats/total)	80 16/20	100 ^{a,b} 20/20	100 ^{a,b} 20/20	75 15/20	85 17/20
Total number of tumors	46	100 ^{a,b}	87 ^a	57	83 ^a
Tumor multiplicity (no. tumors/animal, mean \pm SE)	2.3 \pm 0.5	5.0 \pm 0.7 ^a	4.4 \pm 0.9	2.9 \pm 0.8	4.2 \pm 1.0

^a: $p < 0.05$ in comparison to control LF group; ^b: $p < 0.05$ in comparison to HEVOO group. Continuous variables (latency time, tumor multiplicity): Kruskal–Wallis test. Categorical variables (tumor incidence, total number of tumors): Pearson’s Chi-squared test.

3.2. The High-Corn Oil Diet, but Not the High-EVOO Diet, Had a Clear Effect on Histopathological Malignancy and Proliferation of Tumors

Results for the morphological degree of tumor aggressiveness and proliferation are shown in Figure 1. Histopathological analyses indicated a higher degree of malignancy (both in SBR3 and SBR11 score) in the groups fed the HCO diet in comparison to the groups fed the control and high-EVOO diets. A histological quantitation of proliferation indicated a higher mitosis score in the high-corn oil diet groups versus control, especially in LF-HCO, and a great number of mitoses in both HCO-fed groups in relation to the control. LF-HCO also showed a great number of mitoses in comparison to the high-EVOO diet groups.

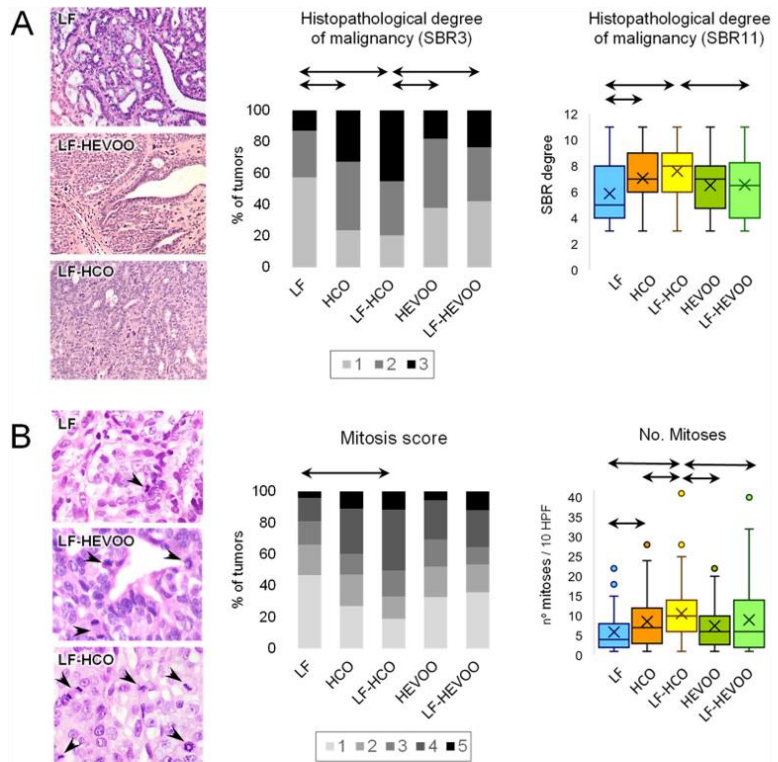


Figure 1. Effect of high-fat diets on the degree of aggressiveness and proliferation of experimental mammary tumors. **(A)** Histopathological classification of tumors. Images show representative DMBA-induced mammary adenocarcinomas with different degree of morphological aggressiveness. Stacked bar chart depicts the distribution of mammary adenocarcinomas of each group according to the Scarff–Bloom–Richardson index, scoring tumors in three categories (SBR3), with the highest representing the most aggressive. Box and whisker plot depicts data of the modified Scarff–Bloom–Richardson index (SBR11) of each tumor. **(B)** Mitosis study. Images show representative determination of mitoses in tumors with different mitosis score. Stacked bar chart depicts the distribution of mammary adenocarcinomas of each group according to the mitosis score. Box and whisker plot depicts data of the number of mitoses in 10 high power field (HPF, 400× magnification) for each tumor. Arrows connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$), Chi-squared test (distribution data: SBR3 and mitosis score), non-parametric Mann–Whitney U test (quantitative data: SBR11 and number of mitoses). LF, $n = 46$; HCO, $n = 100$; LF-HCO, $n = 87$; HEVOO, $n = 57$; LF-HEVOO, $n = 82$. Scale bar.

3.3. The EVOO-Enriched Diet Promoted the Expression of Extrinsic Apoptosis Pathway Proteins

The protein expression levels of extrinsic pathway-related proteins (Fas, FADD total and membrane fraction, TNFR1, TRADD membrane fraction, TRAF2, pro-Caspase-8, and cleaved-Caspase-8) were studied by Western blot and the results are shown in Figure 2 (Original Western blots in Supplementary material). Changes in protein expression levels were observed in FADD, TNFR1, and pro-Caspase-8 with higher levels in the LF-HEVOO group when compared to LF group. When comparing between high-fat diets, FADD (total and membrane fraction), TNFR1, and pro-Caspase-8 showed higher levels in the LF-HEVOO group versus LF-HCO group, while the HEVOO group showed higher FADD and TRADD in comparison to the HCO group. Higher expression levels of TNFR1 and pro-Caspase-8 were also found in LF-HEVOO versus HEVOO.

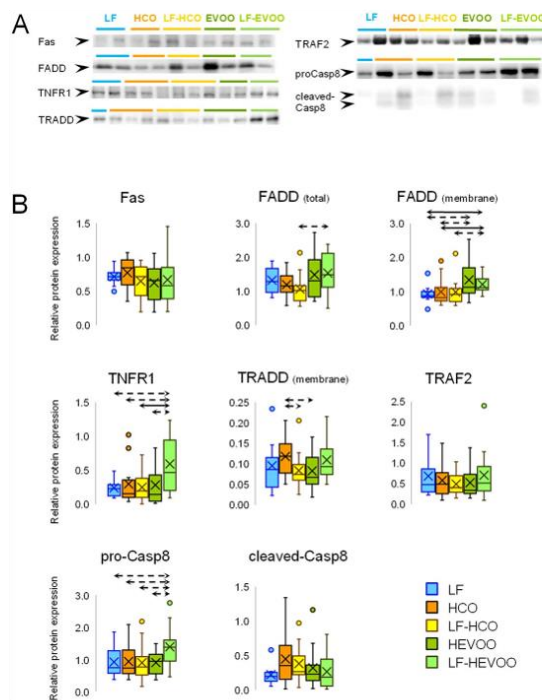


Figure 2. Effect of high-fat diets on the expression of apoptotic extrinsic pathway proteins in experimental tumors. **(A)** Detection of proteins by Western blot in the different groups. **(B)** Box plots represent distribution data for Fas, FADD (total and membrane), TNFR1, TRADD (membrane), TRAF2, and Caspase-8 (pro- and cleaved-Casp8). FADD (membrane) and TRADD (membrane) were detected in the membrane fraction, the other proteins were detected in total protein extract. Box: 25th percentile, median, 75th percentile; whiskers: maximum to minimum; dots: outliers; cross: mean value. Solid arrows connecting groups indicate statistically significant differences ($p < 0.05$), dashed lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$), Kruskal–Wallis test.

3.4. The EVOO-Enriched Diet Increased the Expression of Intrinsic Apoptosis Pathway Proteins

We have also studied proteins involved in the apoptotic intrinsic pathway: the pro-apoptotic Bid and the active tBid, Bak, Bax, Cytochrome C in mitochondrial and cytoplasm fraction, APAF, pro-Caspase-9, cleaved-Caspase-9, and the anti-apoptotic Bcl2 (Figure 3 and Original Western blots in Supplementary material). Relative protein expression levels of the total Bid, tBid, and Cytochrome C (membrane fraction) were higher in the LF-HEVOO

group than in the LF group. This LF-HEVOO group also showed higher levels of total Bid, tBid, Bak, and Bax when compared to the HCO-fed groups, and those of Bid and Bak when compared to the HEVOO group.

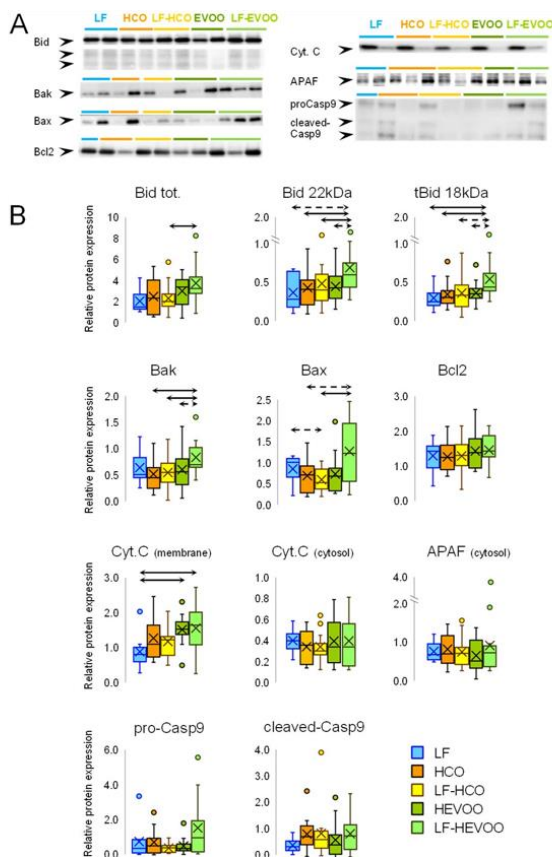


Figure 3. Effect of high-fat diets on the expression of apoptotic intrinsic pathway proteins in experimental tumors. **(A)** Detection of proteins by Western blot in the different groups. **(B)** Box plots represent distribution data for Bid (total and 22 kDa, and the active truncated 18 kDa tBid), Bak, Bax, Bcl2, Cytochrome C (cyt.C) in membrane and cytosol, APAF in cytosol, and Caspase-9 (pro- and cleaved-Casp9). Cyt.c (membrane) was detected in membrane fraction, Cyt.C (cytosol) and APAF (cytosol) were detected in cytosol fraction, the other proteins were detected in total protein extract. Box: 25th percentile, median, 75th percentile; whiskers: maximum to minimum; dots: outliers; cross: mean value. Solid arrows connecting groups indicate statistically significant differences ($p < 0.05$), dashed lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$), Kruskal–Wallis test.

3.5. Effect of High-Fat Diets on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death and in Apoptosis Pathways Convergence

Results for the Caspase-12 protein, which is involved in ER stress-induced cell death, are shown in Figure 4A and in Original Western blots in Supplementary material. There was a trend in the HCO group to have lower levels of pro-Caspase-12, while a trend to have higher levels of the active cleaved form was observed in the LF-HCO group.

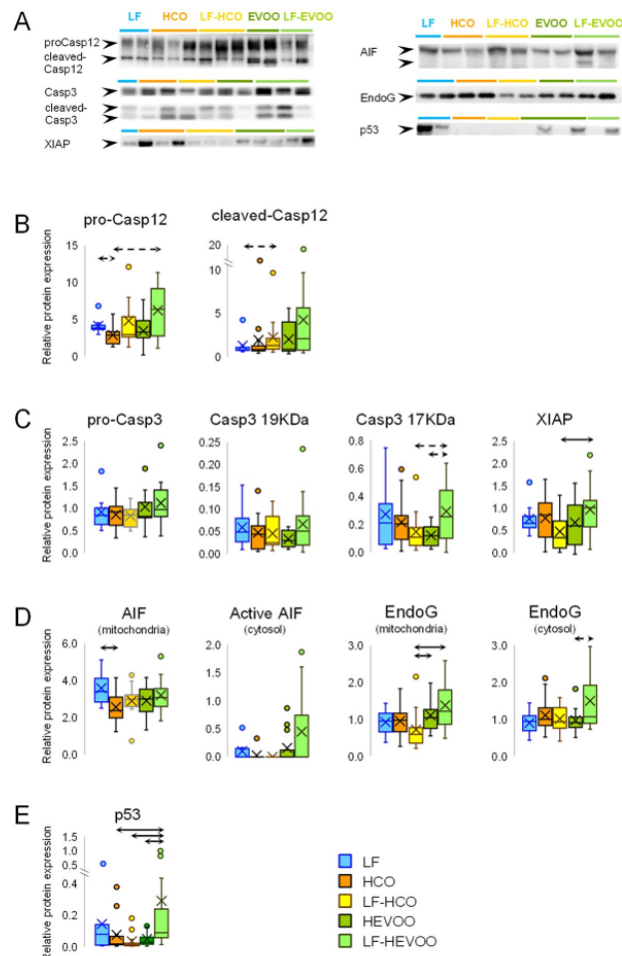


Figure 4. Effect of high-fat diets on the expression of apoptotic proteins in experimental tumors. (A) Detection of proteins by Western blot in the different groups. (B) ER stress-induced apoptosis protein Caspase-12 (pro- and cleaved-Casp12). (C) The key protein in confluence of apoptotic pathways Caspase-3 (pro-Casp3 and the 19 KDa and 17 Da cleaved forms), and its inhibitor XIAP. (D) Caspase-independent cell death proteins AIF (total in mitochondria and active cytosolic AIF levels) and EndoG (mitochondria and cytosolic). (E) Total protein levels of p53. AIF and EndoG were detected in mitochondria fraction and total protein extract, the other proteins were detected in total protein extract. Box: 25th percentile, median, 75th percentile; whiskers: maximum to minimum; dots: outliers; cross: mean value. Solid arrows connecting groups indicate statistically significant differences ($p < 0.05$), dashed lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$), Kruskal–Wallis test.

On the other hand, the protein expression levels of pro-Caspase-3 and active Caspase-3 are shown in Figure 4B and in Supplementary material. There was a trend to have increased levels of 17 kDa cleaved-Caspase-3 in the LF-HEVOO group compared to the LF-HCO and HEVOO groups. The Caspase-3 inhibitor, XIAP, was increased in the LF-HEVOO group in comparison to LF-HCO group.

6. Effect of High-Fat Diets on Caspase Independent Cell Death and on p53

We studied AIF and EndoG as proteins related to caspase-independent cell death (Figure 4C and Original Western blots in Supplementary material). The total AIF (67 KDa) in mitochondria was decreased in the HCO group in comparison to the LF group. Active AIF (57 KDa) in cytosol was detected in a few samples, with a higher frequency (Pearson's Chi-squared test, $p < 0.05$) in the LF-HEVOO group. EndoG levels in mitochondria were significantly higher in the LF-HEVOO and HEVOO groups compared to the LF-HCO group, while there was a trend toward higher levels of cytosolic EndoG in the LF-HEVOO group.

In relation to p53, total levels were significantly higher in the LF-HEVOO group in comparison to all other high-fat diet groups (Figure 4D and Supplementary material).

7. Effect of Oleic and Linoleic Acids on Viability and Apoptosis in Breast Cancer Cells

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with oleic and linoleic acid at different concentrations (1, 10, 100, and 1000 μM) for 24 h, 48 h, and 72 h. As shown in Figure 5A, oleic and linoleic acids had no effects on MCF-7 cell viability. In MDA-MB-231 cells, both fatty acids had a slight stimulating effect compared to the control (increased viability with oleic acid at 10 μM and 1 mM for 72 h, and with linoleic acid at 100 μM after 24 h of treatment). Regarding apoptosis (Figure 5B), no effects on MCF-7 were observed. In MDA-MB-231, both oleic and linoleic acids decreased the percentage of apoptotic cells after 72 h of treatment with the highest doses (Figure 5B).

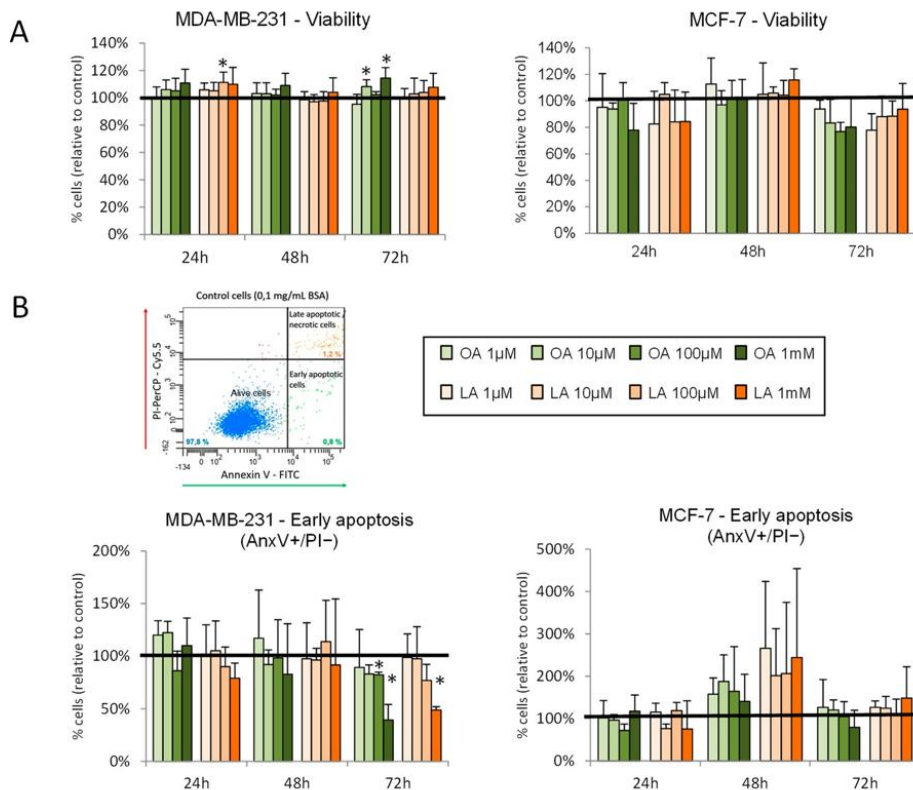


Figure 5. Cont.

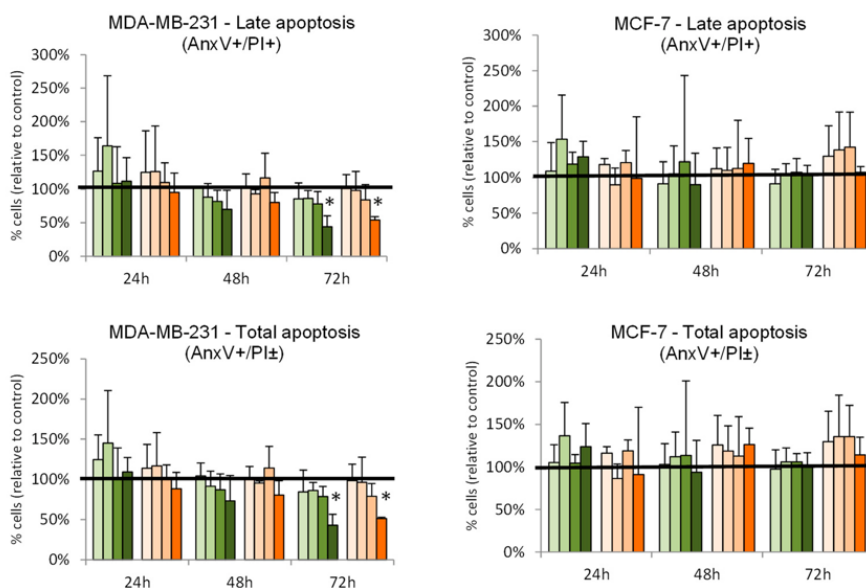


Figure 5. Effects of fatty acid treatments on cell viability and apoptosis in human breast cancer cell lines. (A) Cell viability analysis using the MTT assay of MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines treated with different doses of oleic acid (OA) and linoleic acid (LA) for 24 h, 48 h, or 72 h. (B) Apoptosis analyses by flow-cytometry assay of Annexin V/propidium iodide (PI) double staining. Picture shows a representative image of dot plot diagrams identifying cell population stained with Annexin-V (AnxV, green) and PI (red). For MDA-MB-231 and MCF-7, graphics show the results for cells in early apoptosis (AnxV+/PI−), late apoptosis (AnxV+/PI+), and total apoptosis (AnxV+/PI±), relative to control cells. Mean + standard deviation of three–five independent experiments. *: $p < 0.05$ compared to control cells (0.1 mg/mL of BSA).

3.8. EVOO Main Polyphenols Affected Cell Viability in Breast Cancer Cells

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with different doses of hydroxytyrosol (HT), oleuropein (OLE), and luteolin (LUT) for 24, 48, and 72 h. Figure 6 depicts the comparison of treated cells versus control cells (treated only with 0.1% DMSO). HT had a time- and dose-dependent effect, decreasing cell viability both in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. At the highest dose (400 μM), HT decreased viability at 48 h and 72 h in both cell lines. At 72 h, viability was also decreased with 100 μM (MDA-MB-231) and 250 μM (MDA-MB-231 and MCF-7). By 72 h, OLE at 50 μM decreased viability in both cell lines, and in MCF-7 there was also a significant effect at 30 μM after 48 h and 72 h. LUT did not decrease viability at the doses used in these cell lines; we only observed an increase in MDA-MB-231 with 5 μM by 24 h.

A comparison among different doses and times of treatment are indicated in Figure S3. In both lines, cells treated with 400 μM of HT for 48 h and 72 h showed a significant decrease in the cell viability in comparison to cells treated with 100 μM and 250 μM . At 400 μM there were also a time-dependent effect, especially in MDA-MB-231 cells (lower viability at higher times of treatment). MDA-MB-231 cells treated with OLE 50 μM for 72 h had a decreased viability in comparison to cells treated with OLE at 30 μM . The highest concentration of LUT (30 μM) for 72 h also decreased cell viability in comparison to LUT at 5 μM and 10 μM .

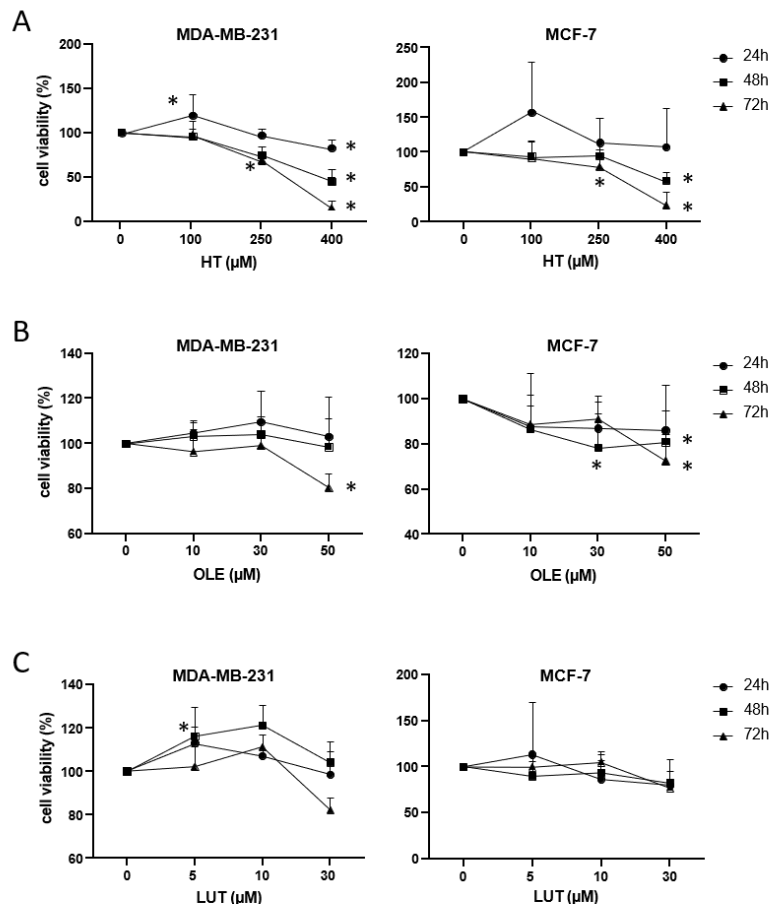


Figure 6. Effect of EVOO minor compounds on cell viability in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines treated with different doses for 24 h, 48 h, or 72 h, relative to control cells (0 µM). (A) Hydroxytyrosol (HT). (B) Oleuropein (OLE). (C) Luteolin (LUT). Mean + standard deviation of three independent experiments. *: $p < 0.05$ compared to control cells (0.1% DMSO-treated).

3.9. Hydroxytyrosol Promoted Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines

Annexin V/PI staining and flow cytometry were used to evaluate the effect of EVOO polyphenols in cell apoptosis. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with increasing doses of HT, OLE, and LUT for 24 h and 48 h. Figure 7 shows results for early apoptosis (annexin positive/propidium iodide negative-labeled cells) and late apoptosis (annexin positive/propidium iodide positive-labeled cells), and a percentage of live and apoptotic cells for each treatment in MDA-MB-231 (Figure 7A,C,E) and MCF-7 (Figure 7B,D,F). HT increased early apoptosis in both cell lines (especially at 48 h in MDA-MB-231, Figure 7A, and at the highest dose after 24 h and 48 h in MCF-7, Figure 7B). The highest dose (400 µM) also increased late apoptosis after 48 h in MDA-MB-231 cells. A comparison of the percentage of live/apoptotic cells among doses showed a significant dose-effect after 48 h in both cell lines, with a higher percentage of apoptotic cells in 400 µM-treated cells compared to all other doses. Few differences were found with OLE and LUT treatments, with no clear trend.

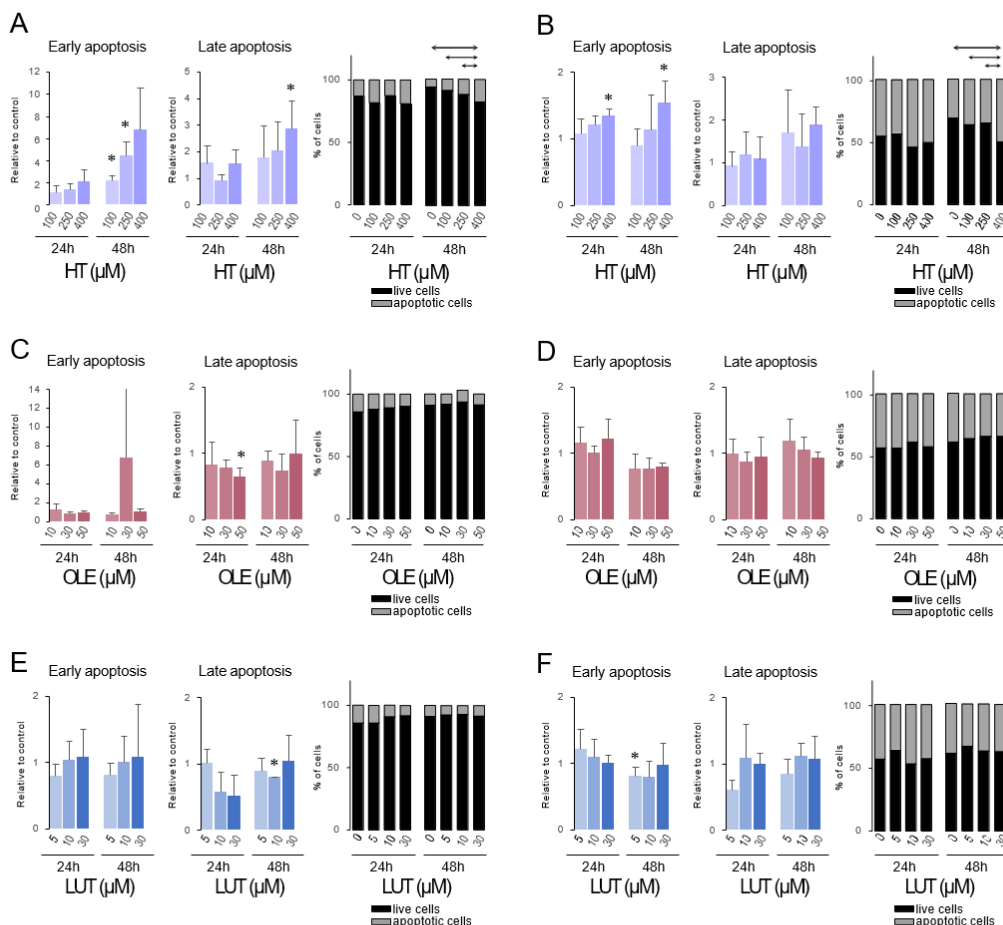


Figure 7. Effect of treatment with HT, OLE, and LUT on apoptosis in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. Apoptosis analyses by flow-cytometry assay of Annexin V/propidium iodide (PI) double staining in MDA-MB-231 (A,C,E) and MCF-7 (B,D,F) cells treated with different doses of hydroxytyrosol (A,B), oleuropein (C,D), or luteolin (E,F) for 24 h or 48 h. For each treatment and cell line, results show values of early apoptosis compared to control cells (0.1% DMSO-treated cells), values of late apoptosis compared to control cells, and percentage of live/apoptotic cells. Histograms show mean + standard deviation of three independent experiments. *: $p < 0.05$ compared to control cells (0.1% DMSO-treated). Solid lines connecting bars indicate statistically significant differences between doses.

3.10. Hydroxytyrosol Did Not Significantly Affect Cell Cycle or Mitochondrial Membrane Potential in MCF-7

Further analysis on the effect of HT was carried out on MCF-7 cells. We studied by flow cytometry the cycle of cells treated with HT at 400 μ M for 24, 48, and 72 h (Figures 8A and S4A). On the other hand, mitochondrial membrane potential was analyzed by staining with JC-1, a cationic dye indicator of potential-dependent accumulation in the mitochondria (Figures 8B and S4B). No statistically significant differences were observed in the HT treatment.

these high-fat diets on the expression profiles of genes related to metabolism, proliferation, and apoptosis pathways [9]. Thus, we have analyzed in the experimental tumors the effect of diets on the protein levels of several pathways leading to cell death: intrinsic, extrinsic, ER stress-induced, and caspase-independent (Figure S1). The results showed that several pro-apoptotic proteins increased in the tumors from animals fed the EVOO diet, especially in the LF-HEVOO group. In this group, we found higher levels of the proteins of the extrinsic apoptosis pathway TNFR1, FADD, and pro-Caspase-8, although there were no differences in active-Caspase-8 levels. On the other hand, several mitochondrial proteins with a role in the intrinsic apoptosis pathway were also increased (tBid, Bax, Bak, and Cytochrome C), and no differences were found in cytoplasmic Cytochrome C or active-Caspase-9. Caspase-12, involved in ER stress-induced apoptosis, showed a tendency to be increased in the LF-HEVOO group, and the active-Caspase-12 increased in the LF-HCO group. Caspase-3, the key protein in the confluence of the apoptotic pathways, showed no marked changes, which could be related to the increase in its inhibitor XIAP. Despite this, a statistical trend towards higher levels of 17 kDa cleaved-Caspase-3 was found in the LF-HEVOO group. Regarding the caspase-independent pathway, membrane EndoG levels were increased in such EVOO diet groups, also showing a trend towards higher levels of cytosolic EndoG. Although few samples showed active AIF, the percentage of tumors with detectable cytoplasmic levels of active AIF was significantly higher in the LF-HEVOO group. Finally, we also observed significantly higher levels of the p53 protein in this group. Taken together, all these results raise several hypotheses. One is that, given the complexity and heterogeneity of the experimental tumors, the set of results is much more informative than the specific proteins, so these data suggest greater cell death due to the effect of the high-EVOO diet through several pathways. Another possibility is that despite observing increases in various pro-apoptotic proteins, anti-apoptotic proteins are also upmodulated, thus some effectors are not increased. Additionally, little changes in these proteins are enough to contribute to the aggressive phenotype in the context of other pathways, and methodological issues cannot be ruled out. In any case, the analysis of all these proteins and pathways suggests that cell death could be increased in the LF-HEVOO group (which displays a tendency towards greater levels of cleaved-Caspase-3, active AIF, EndoG, and p53), which is consistent with the histopathological characteristics of this group. The fact that the same results have not been found in the group fed this diet from weaning (HEVOO) is consistent with the greater volume of their tumors [9,12]. It is also concordant with metabolic changes observed in the HEVOO group, i.e., an increase in glycolysis and PPP, which has been associated with a decrease in apoptosis [13]. This metabolic profile favors NADPH generation, which may lead to caspase inhibition [31,32].

Further analyses were performed with the components of the oils in different cell lines characteristic of different molecular subtypes of human breast cancer: MDA-MB-231, representing the triple-negative molecular subtype, and MCF-7, representing the Luminal A subtype. MCF-7 is a non-aggressive, hormone receptor-positive, and non-invasive cell line, while the MDA-MD-231 cell line is an estrogen receptor-, progesterone receptor-, and HER2-negative, highly proliferative and invasive cell line [33]. In accordance, the proliferation rate was higher in MDA-MD-231 cells, while the percentage of cells in apoptosis was lower in comparison to MCF-7 cells. We analyzed cell viability and apoptosis in cells treated with the main fatty acids of the two oils used in vivo: oleic acid (main fatty acid of EVOO) and linoleic acid (main fatty acid of corn oil). In MDA-MB-231, but not in MCF-7, both fatty acids had a slight effect on viability, while the higher doses after 72 h decreased apoptosis. It is likely that the effect of oleic acid depends on time, dose, and the type of cell. It has been reported in other cell lines that oleic acid treatment induced apoptosis [34,35], but it has also been shown to increase proliferation, migration, or invasion in cancer cells [36,37]. It has been suggested that the heterogeneity in fatty acid metabolism may be at the basis of the different response of cell lines to fatty acid treatments [38]. On the other hand, we analyzed the effect of some of the main minor compounds of EVOO: the secoiridoid oleuropein (OLE), its metabolite hydroxytyrosol (HT), and the main flavonoid luteolin

(LUT) [39]. HT and OLE had a dose- and time-dependent effect, decreasing cell viability on both MDA-MB-231 and MCF-7 cells. HT also stimulated apoptosis in both cell lines, while little effect was observed with OLE and LUT. The preliminary results with HT have not shown changes by this polyphenol in cell cycle or membrane potential, the latter suggesting that apoptosis would not be led from the intrinsic pathway, although further analyses are needed to elucidate the involvement of the different cell death pathways. The results with hydroxytyrosol and oleuropein agree with those described by other authors in relation to their anti-proliferative and apoptotic properties [40,41]. On the contrary, with the doses used, and in these cell lines, we did not find a significant effect of luteolin on viability and apoptosis, although other authors reported anti-inflammatory and antioxidant effects [42], and tumor suppressor activity in DMBA-induced tumors [43,44]. Recently, a mitogenic effect of oleic acid has also been observed in colon cancer cells, while the effect of several minor compounds of EVOO was the opposite [45], which highlights the importance of the specific composition of the oils consumed and the complexity of the interaction of nutritional factors *in vivo*.

All this data suggest that dietary fats have a molecular effect on tumors that influences their histopathological degree and proliferation through various mechanisms, specific and nonspecific, that interact with each other, creating a myriad of responses. The results are consistent, for example, with changes in the membrane composition of tumors as a function of the type of lipid consumed [46,47], concomitantly with a specific effect of different minor compounds, which would have effects in different signaling pathways heterogeneously. Thus, we have observed increases in the EVOO groups in the proteins involved in the extrinsic apoptosis pathway, in which changes in microdomains can have a role, and in intrinsic and caspase-independent pathways, which can be also related to the effect of EVOO minor compounds. In this sense, we have previously observed changes in p21Ras location and activity, which has been related to an oleic acid-enrichment of membranes that can modify microdomains and thus several signaling pathways [12,46]. In addition, our *in vitro* results, both in hormone receptor-positive (representing Luminal A human breast cancer) and hormone receptor-negative (representing the triple-negative subtype) cells, suggest that HT and OLE are able to influence different breast cancer cell lines through estrogen receptor-independent pathways. In the case of the rodent DMBA model, the mammary tumors developed reflect the most common less-aggressive human breast cancer, being hormone-sensitive, low proliferative, and with no overexpression of HER2 [23,48]. In any case, data in the literature suggest several mechanisms of action of EVOO minor compounds, including hormone receptor-dependent and -independent effects [49]. Many EVOO components have shown anticancer activities by modulating gene expression, the direct activation/inhibition of proteins and enzymes, or antioxidant activity, which may in turn regulate apoptosis [49,50].

The results also showed the effect of the timing of dietary intervention. High-fat diets were administered from weaning (groups HCO and HEVOO), or after induction (groups LF-HCO and LF-EVOO). Both groups fed the high-EVOO diet had lower clinical and histopathological levels of malignancy than high corn oil diet groups. However, the LF-HCO group had the highest degree of clinical and morphological malignancy, while LF-EVOO is the group in which more differences in cell death proteins have been found. In previous works, we have observed that the high-fat diets, especially the high corn oil diet, advanced the puberty onset [10]. Thus, with an accelerated puberty maturation, the observed difference in carcinogenesis yield can be related to the different degree of differentiation that the mammary gland was at during the time of the carcinogenic insult. If the mammary gland of groups LF-HCO and LF-HEVOO were less differentiated at the time of induction, the gland could be more sensitive to the influence of the high-fat diets, clearly carcinogenesis-promoting in the case of the high corn oil diet (resulting in the highest degree of malignancy in the LF-HCO group), and with an effect of EVOO on cell death pathways (more evident in the LF-EVOO group). Moreover, we also previously observed an increase in body weight and mass if the high corn oil diet is administered from

weaning [10]. Considering that advanced puberty onset and obesity are known risk factors of breast cancer, our results highlight the importance of acquiring healthy choices from an early age.

Despite the variability of some results, the group of tumors from animals fed with the high-EVOO diet have different characteristics, such as low proliferation, modifications in several cell death pathways, and the reported metabolic changes [13]. However, neither of these pathways, without the interrelation of all networks, characterized by itself the clinical manifestation and the degree of tumor aggressiveness *in vivo*. *In vitro* analyses support an effect of EVOO on proliferation and apoptosis, with minor compounds such as hydroxytyrosol and oleuropein playing a role. *In vivo*, it is likely that the fatty acids also have a role as carriers of minor compounds and/or in the absorption of such compounds, in addition to the reported importance of the ratio between fatty acids on breast cancer risk [51,52]. Taking into account the tumor-promoting influence of a high intake of total fat [28,29], our investigations support the beneficial effect of the moderate intake of extra-virgin olive oil (which contains all the bioactive elements) on the risk of breast cancer. The complexity of this disease suggests that the effects of nutritional factors are subtle, heterogeneous, and probably in the long-term, but potentially relevant, especially considering that exposure, depending on dietary habits, can occur chronically throughout life. Thus, more investigation on the effects and mechanisms of these modifiable factors is needed, which can provide important scientific bases for dietary recommendations in health and disease.

5. Conclusions

The results reported show the specific effect of the type of dietary lipid in breast carcinogenesis with the diet high in n-6 PUFA diet but not the high-EVOO diet, promoting mammary tumors with a high degree of histopathological malignancy and proliferation. This is the first study reporting that EVOO increased proteins leading to different cell death pathways in experimental mammary tumors. *In vitro* results support that the potential beneficial effect of EVOO is mainly elicited by its minor components, such as hydroxytyrosol (decreased tumor cell variability and increased cell death), and highlight the importance of specific food compositions (e.g., different effects of olive oil, extra-virgin olive oil, and oleic acid-enriched seed oil) in breast cancer prevention and treatment strategies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14040905/s1>. Figure S1: cell death signaling pathways; Figure S2: experimental design; Figure S3: cell viability of MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines treated with EVOO minor compounds; Figure S4: original plots of the *in vitro* analysis of cell cycle and apoptosis by flow cytometry; Original Western blot data: original blots and densitometry analyses for all the proteins studied.

Author Contributions: Conceptualization, E.E. and R.M.; funding acquisition, E.E. and R.M.; investigation, M.G.-G., M.M., I.C., E.V. and M.G.; methodology, M.G.-G., M.M., I.C., E.V., M.G., E.E. and R.M.; project administration, E.E. and R.M.; supervision, R.M.; writing—original draft, M.G.-G., M.M. and R.M.; writing—review and editing, all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Plan Nacional de I + D + I” (AGL2006-07691); “Fundación Patrimonio Comunal Olivarero (FPCO)” (FPCO2008-165.396; FPCO2013-CF611.084); “Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente” (AAO2008-165.471); “Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español (OIAOE)” (OIP2009-CD165.646); “Departaments de Salut i d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya” (GC2010-165.000); and FPCO and OIAOE (FPCO-OIP2016-CF614.087).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee of Animal and Human Experimentation of Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH 566/3616).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Molecular data from Western blots generated in this study are included in Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. IARC Global Cancer Observatory. GLOBOCAN. 2021. Available online: <https://gco.iarc.fr> (accessed on 15 December 2021).
2. World Cancer Research Fund; American Institute for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: A Global Perspective. Continuous Update Project Expert Report. 2018. Available online: <https://www.wcrf.org/diet-and-cancer/> (accessed on 15 December 2021).
3. Escrich, E.; Solanas, M.; Moral, R. Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: Experimental approaches. In *Olive Oil and Health*; Quiles, J.L., Ramírez-Tortosa, M.C., Yaqoob, P., Eds.; CABI Publishing: Oxford, UK, 2006; pp. 317–374.
4. Escrich, E.; Solanas, M.; Moral, R.; Escrich, R. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 813–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Buckland, G.; Travier, N.; Cottet, V.; González, C.A.; Luján-Barroso, L.; Agudo, A.; Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Peeters, P.H.; et al. Adherence to the mediterranean diet and risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort study. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2918–2927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Schwingshackl, L.; Schwedhelm, C.; Galbete, C.; Hoffmann, G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2017**, *9*, 1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Di Daniele, N.; Noce, A.; Vidiri, M.F.; Moriconi, E.; Marrone, G.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; D’Urso, G.; Tesaro, M.; Rovella, V.; De Lorenzo, A. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 8947–8979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Solanas, M.; Hurtado, A.; Costa, I.; Moral, R.; Menéndez, J.A.; Colomer, R.; 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*, 745–753. [[CrossRef](#)]
9. Escrich, R.; Costa, I.; Moreno, M.; Cubedo, M.; Vela, E.; Escrich, E.; Moral, R. A high-corn-oil diet strongly stimulates mammary carcinogenesis, while a high-extra-virgin-olive-oil diet has a weak effect, through changes in metabolism, immune system function and proliferation/apoptosis pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *64*, 218–227. [[CrossRef](#)]
10. Moral, R.; Escrich, R.; Solanas, M.; Vela, E.; Costa, I.; de Villa, M.C.R.; 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*, 410–420. [[CrossRef](#)]
11. Moral, R.; Escrich, R.; Solanas, M.; Vela, E.; de Villa, M.C.R.; Escrich, E. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 1397–1409. [[CrossRef](#)]
12. Solanas, M.; Grau, L.; Moral, R.; Vela, E.; Escrich, R.; Escrich, E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis* **2009**, *31*, 871–879. [[CrossRef](#)]
13. Garcia-Guasch, M.; Navarro, L.; Rivero, V.; Costa, I.; Escrich, E.; Moral, R. A high extra-virgin olive oil diet induces changes in metabolic pathways of experimental mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.* **2022**, *99*, 108833. [[CrossRef](#)]
14. Jin, L.; Zhou, Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 4213–4221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Voza, A.; Parisi, G.; De Leonardis, F.; Lasorsa, F.M.; Castegna, A.; Amorese, D.; Marmo, R.; Calcagnile, V.M.; Palmieri, L.; Ricquier, D.; et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 960–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Faubert, B.; Solmonson, A.; DeBerardinis, R.J. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* **2020**, *368*, eaaw5473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [[CrossRef](#)]
18. Wong, R.S. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87. [[CrossRef](#)]
19. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 395–417. [[CrossRef](#)]
20. Rajabi, S.; Maresca, M.; Yumashev, A.V.; Chooapani, R.; Hajimehdipour, H. The Most Competent Plant-Derived Natural Products for Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Biomolecules* **2021**, *11*, 534. [[CrossRef](#)]
21. Escrich, E.; Solanas, M.; Segura, R. Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: I—Diet definition. *In Vivo* **1994**, *8*, 1099–1106.
22. Escrich, E.; Solanas, M.; de Villa, R.M.C.; Ribalta, T.; Muntane, J.; Segura, R. Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: II—Suitability of the diets. *In Vivo* **1994**, *8*, 1107–1112.

23. Costa, I.; Solanas, M.; Escrich, E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in the rat: A comparative analysis with human breast tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2002**, *126*, 915–927. [\[CrossRef\]](#)
24. Gürtler, A.; Kunz, N.; Gomolka, M.; Hornhardt, S.; Friedl, A.A.; McDonald, K.; Kohn, J.E.; Posch, A. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal. Biochem.* **2013**, *433*, 105–111. [\[CrossRef\]](#)
25. Calahorra, J.; Martínez-Lara, E.; Granadino-Roldán, J.M.; Martí, J.M.; Cañuelo, A.; Blanco, S.; Oliver, F.J.; Siles, E. Crosstalk between hydroxytyrosol, a major olive oil phenol, and HIF-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Przychodzen, P.; Kuban-Jankowska, A.; Wyszowska, R.; Barone, G.; Bosco, G.L.; Celso, F.L.; Kamm, A.; Daca, A.; Kostrzewa, T.; Gorska-Ponikowska, M. PTP1B phosphatase as a novel target of oleuropein activity in MCF-7 breast cancer model. *Toxicol. In Vitro* **2019**, *67*, 104624. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Huang, L.; Jin, K.; Lan, H. Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 3842–3850. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Guthrie, N.; Carroll, K.K. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog. Lipid Res.* **1999**, *38*, 261–271. [\[CrossRef\]](#)
29. Sieri, S.; Krogh, V.; Ferrari, P.; Berrino, F.; Pala, V.; Thiébaud, A.C.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K.; Jakobsen, M.U.; et al. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 1304–1312. [\[CrossRef\]](#)
30. Matsuura, K.; Canfield, K.; Feng, W.; Kurokawa, M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2016**, *327*, 43–87. [\[CrossRef\]](#)
31. Yi, C.H.; Vakifahmetoglu-Norberg, H.; Yuan, J. Integration of apoptosis and metabolism. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2011**, *76*, 375–387. [\[CrossRef\]](#)
32. Majors, B.S.; Betenbaugh, M.J.; Chiang, G.G. Links between metabolism and apoptosis in mammalian cells: Applications for anti-apoptosis engineering. *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 317–326. [\[CrossRef\]](#)
33. Holliday, D.L.; Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 215. [\[CrossRef\]](#)
34. Yamagata, K.; Uzu, E.; Yoshigai, Y.; Kato, C.; Tagami, M. Oleic acid and oleoylethanolamide decrease interferon-gamma-induced expression of PD-L1 and induce apoptosis in human lung carcinoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *903*, 174116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Carrillo, C.; Cavia, M.M.; Alonso-Torre, S.R. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action: A review. *Nutr. Hosp.* **2012**, *27*, 1860–1865. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Zhao, J.; Zhi, Z.; Wang, C.; Xing, H.; Song, G.; Yu, X.; Zhu, Y.; Wang, X.; Zhang, X.; Di, Y. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2105–2115. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Marcial-Medina, C.; Ordoñez-Moreno, A.; Gonzalez-Reyes, C.; Cortes-Reynosa, P.; Salazar, E.P. Oleic acid induces migration through a FFAR1/4, EGFR and AKT-dependent pathway in breast cancer cells. *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, 252–265. [\[CrossRef\]](#)
38. Balaban, S.; Lee, L.S.; Varney, B.; Aishah, A.; Gao, Q.; Shearer, R.F.; Saunders, D.N.; Grewal, T.; Hoy, A.J. Heterogeneity of fatty acid metabolism in breast cancer cells underlies differential sensitivity to palmitate-induced apoptosis. *Mol. Oncol.* **2018**, *12*, 1623–1638. [\[CrossRef\]](#)
39. Jimenez-Lopez, C.; Carpena, M.; Lourenço-Lopes, C.; Gallardo-Gomez, M.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods* **2020**, *9*, 1014. [\[CrossRef\]](#)
40. Romani, A.; Ieri, F.; Urciuoli, S.; Noce, A.; Marrone, G.; Nediani, C.; Bernini, R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* **2019**, *11*, 1776. [\[CrossRef\]](#)
41. Imran, M.; Nadeem, M.; Gilani, S.A.; Khan, S.; Sajid, M.W.; Amir, R.M. Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 1781–1791. [\[CrossRef\]](#)
42. Antoniou, C.; Hull, J. The Anti-cancer Effect of *Olea europaea* L. Products: A Review. *Curr. Nutr. Rep.* **2021**, *10*, 99–124. [\[CrossRef\]](#)
43. Cook, M.T.; Mafuvadze, B.; Besch-Williford, C.; Ellersieck, M.R.; Goyette, S.; Hyder, S.M. Luteolin suppresses development of medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 825–832. [\[CrossRef\]](#)
44. Samy, R.P.; Gopalakrishnakone, P.; Ignacimuthu, S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *64*, 1–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Storniolo, C.E.; Martínez-Hovelman, N.; Martínez-Huélamo, M.; Lamuela-Raventos, R.M.; Moreno, J.J. Extra Virgin Olive Oil Minor Compounds Modulate Mitogenic Action of Oleic Acid on Colon Cancer Cell Line. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 11420–11427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Escrich, E.; Solanas, M.; Soler, M.; de Villa, M.C.R.; Sanchez, J.A.; Segura, R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, *12*, 536–549. [\[CrossRef\]](#)
47. Hulbert, A.J.; Turner, N.; Storlien, L.H.; Else, P.L. Dietary fats and membrane function: Implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2005**, *80*, 155–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Clarke, R.; Jones, B.C.; Sevigny, C.M.; Hilakivi-Clarke, L.A.; Sengupta, S. Experimental models of endocrine responsive breast cancer: Strengths, limitations, and use. *Cancer Drug Resist.* **2021**, *4*, 762–783. [\[CrossRef\]](#)

49. Moral, R.; Escrich, E. Influence of olive oil and its components on breast cancer: Molecular mechanisms. *Molecules* **2022**, *27*, 477. [\[CrossRef\]](#)
50. Chen, Y.; Zhang, H.; Zhou, H.J.; Ji, W.; Min, W. Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. *Cancers* **2016**, *8*, 40. [\[CrossRef\]](#)
51. Simopoulos, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 365–379. [\[CrossRef\]](#)
52. Sczaniecka, A.K.; Brasky, T.M.; Lampe, J.W.; Patterson, R.E.; White, E. Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL cohort. *Nutr. Cancer* **2012**, *64*, 1131–1142. [\[CrossRef\]](#)

Article científic 3

Metabolomics insights into the differential response of breast cancer cells to the polyphenols Hydroxytyrosol and Luteolin

Maite Garcia-Guasch 1, Eduard Escrich 1, Raquel Moral 1,* and Iola F. Duarte 2,*

1 Physiology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain.

2 CICECO—Aveiro Institute of Materials, Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

Plantejament i objectiu

La principal font de lípids de la dieta mediterrània és l'oli d'oliva. Aquest oli, i en concret el verge extra (OOVE), presenta més de 230 components bioactius, alguns dels quals se'ls ha atribuït propietats antitumorals. En aquest sentit, resultats previs han mostrat la disminució de la viabilitat cel·lular i l'increment de l'apoptosi en cèl·lules tumorals mamàries, sobretot per part de l'hidroxitirosol.

La reprogramació metabòlica és un *hallmark* important del càncer, implicat en molts aspectes de l'inici i la progressió tumoral. L'efecte Warburg és una de les reprogramacions metabòliques més clàssiques que consisteix en el canvi del metabolisme oxidatiu de la glicòlisi a la fermentació a lactat en condicions aeròbiques. Les cèl·lules tumorals també presenten canvis en el metabolisme dels aminoàcids, especialment un increment de la glutaminòlisi, i canvis en vies metabòliques relacionades amb l'estrès oxidatiu i/o la biosíntesi de molècules com el metabolisme d'un carboni. A més, també s'han descrit canvis en el metabolisme lipídic i síntesi del colesterol.

L'objectiu d'aquest estudi és investigar l'efecte de dos compostos fenòlics de l'OOVE, hidroxitirosol i luteolina, en el metaboloma de cèl·lules de càncer de mama.

Metodologia

En aquest estudi, es van utilitzar dues línies cel·lulars representatives de diferents subtipus moleculars de càncer de mama: les cèl·lules MDA-MB-231 (subtipus triple negatiu, hormono-independents, alt grau d'agressivitat), i MCF-7 (subtipus luminal A, sensibles a hormones).

Resultats

En primer lloc, es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular per determinar la citotoxicitat dels dos polifenols (HT i LUT) en les dues línies cel·lulars i establir les concentracions de tractament. Tot seguit les cèl·lules van ser tractades durant 72 h, i posteriorment fraccionades. Es va procedir a l'extracció dels metabòlits, tant del medi cel·lular com de les fraccions aquoses i lipídiques de les cèl·lules. L'anàlisi del metaboloma es va dur a terme usant l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) per a l'obtenció d'espectres d'¹H.

Per a l'anàlisi multivariada es van aplicar les anàlisis PCA i PLS-DA. Per proporcionar una mesura més quantitativa de les variacions metabòliques, els senyals seleccionats es van integrar fent servir l'Amix-Viewer 3.9.15 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanya) i es van normalitzar segons l'àrea total.

Resultats

L'estudi de la viabilitat de les dues línies tumorals (MDA-MB-231 i MCF-7) amb el tractament dels dos polifenols (HT i LUT) va revelar un efecte diferent segons la línia cel·lular, de forma que les cèl·lules MDA-MB-231 es van veure afectades per l'HT a concentracions més baixes, mentre que les cèl·lules MCF-7 van resultar més sensibles al tractament amb LUT.

A nivell metabòlic, els resultats obtinguts van revelar que la resposta cel·lular al tractament amb polifenols també era dependent del tipus cel·lular. El tractament de la línia MDA-MB-231 amb els dos polifenols va disminuir la captació de glucosa i/o el flux glicolític i es va observar una desviació de la glicòlisi cap a la biosíntesi d'hexosamina (HBP, de l'anglès *hexosamine biosynthetic pathway*). Pel contra, el tractament de les cèl·lules MCF-7 va incrementar el flux glicolític. En ambdues línies cel·lulars, es va veure un increment del metabolisme mitocondrial, així com un increment en la producció d'acetat, derivat possiblement del piruvat per l'acció de ROS. A més, també es va observar un increment dels nivells de format, que resulta del catabolisme excessiu de la serina per proporcionar unitats de carboni necessàries per a la biosíntesi, observació coherent amb la disminució de la proliferació cel·lular. Altres resultats, com la disminució del metabolisme dels aminoàcids de cadena ramificada (BCAA), vistos en les cèl·lules MCF-7 per l'acció de l'HT també reflecteixen la disminució de la proliferació cel·lular. D'altra banda, el tractament amb els dos polifenols en les

Resultats

cèl·lules MDA-MB-231 i amb LUT a les cèl·lules MCF-7 va incrementar els nivells de GSH. Aquests resultats coincideixen amb altres estudis que han descrit un augment de la síntesi i/o regeneració de GSH després del tractament de cèl·lules tumorals i no tumorals amb ambdós polifenols. De fet, aquests i altres polifenols són àmpliament coneguts per la seva capacitat per modular l'estrès oxidatiu a les cèl·lules tumorals, presentant activitats antioxidants o prooxidants.

L'anàlisi dels extractes lipídics també va revelar la importància de la línia cel·lular en la resposta al tractament a HT i LUT. Els canvis observats en les cèl·lules MDA-MB-231 després del tractament van suggerir la ruptura dels glicerofosfolípids de membrana i la incorporació dels seus àcids grassos en lípids neutres emmagatzemats en gotes citosòliques. Altrament, els canvis observats pel tractament amb LUT en les cèl·lules MCF-7 van suggerir la degradació de les gotes lipídiques. Tot i això, en ambdues línies, el tractament amb ambdós polifenols va induir a més una disminució dels nivells de colesterol i canvis en la proporció d'àcids grassos insaturats, compatibles amb un impacte en la composició de la membrana cel·lular.

Aportacions més rellevants

- L'estudi de metabolòmica de les línies cel·lulars representatives de càncer de mama va revelar una extensa reprogramació metabòlica després del tractament amb HT i LUT.
- En general, el tractament amb LUT va afectar principalment el metaboloma de les cèl·lules MDA-MB-231, mentre que l'HT va tenir un impacte major en les MCF-7. Fet que destaca la importància del context metabòlic i molecular en els efectes que els factors nutricionals poden tenir sobre les cèl·lules tumorals
- Els dos fenols, en els dos tipus cel·lulars, van tenir efectes comuns que inclouen l'estimulació del metabolisme mitocondrial (amb nivells de NAD⁺ i ATP no alterats/aumentats), la producció d'acetat (possiblement a partir de la conversió de piruvat induïda per ROS) i la secreció de format (probablement relacionada amb l'adaptació del metabolisme d'un carboni per reduir necessitats biosintètiques, fet que concorda amb la disminució de la viabilitat).
- Els efectes en el metabolisme de la glucòlisi i el metabolisme dels lípids depenen clarament del tipus cel·lular. A les cèl·lules MDA-MB-231, els dos polifenols

Resultats

inhibirien la glicòlisi (fomentant l'HBP) i estimularien l'acumulació de lípids neutres. Contràriament, en cèl·lules MCF-7 tractades es produiria una regulació positiva del flux glicolític i, en el cas de l'exposició a HT, la ruptura dels lípids neutres.

- L'HT incrementa el consum de metionina i disminueix els nivells intracel·lulars de GSH, indicant un possible augment de l'estrès oxidatiu.

Article

Metabolomics Insights into the Differential Response of Breast Cancer Cells to the Phenolic Compounds Hydroxytyrosol and Luteolin

Maite Garcia-Guasch ¹, Eduard Escrich ¹, Raquel Moral ^{1,*} and Iola F. Duarte ^{2,*}

¹ Physiology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain;

maria.teresa.garcia.guasch@uab.cat (M.G.-G.); eduard.escrich@uab.cat (E.E.) CICECO—

² Aveiro Institute of Materials, Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

* Correspondence: raquel.moral@uab.cat (R.M.); ioladuarte@ua.pt (I.F.D.)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of two phenolic compounds found in extra virgin olive oil, hydroxytyrosol (HT) and luteolin (LUT), on the metabolism of breast cancer (BC) cells of different molecular subtypes. An untargeted metabolomics approach was used to characterize the metabolic responses of both triple-negative MDA-MB-231 cells and hormone-responsive MCF-7 cells to treatment with these phenols. Notably, while some effects were common across both cell types, others were dependent on the cell type, highlighting the importance of cellular metabolic phenotype. Common effects included stimulation of mitochondrial metabolism, acetate production, and formate overflow. On the other hand, glucose metabolism and lactate production were differentially modulated. HT and LUT appeared to inhibit glycolysis and promote the hexosamine biosynthetic pathway in MDA-MB-231 cells, while MCF-7 cells exhibited higher glycolytic flux when treated with phenolic compounds. Another significant difference was observed in lipid metabolism. Treated MDA-MB-231 cells displayed increased levels of neutral lipids (likely stored in cytosolic droplets), whereas treatment of MCF-7 cells with HT led to a decrease in triacylglycerols. Additionally, glutathione levels increased in MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT, as well as in MCF-7 cells treated with LUT. In contrast, in HT-treated MCF-7 cells, glutathione levels decreased, indicating different modulation of cellular redox status. Overall, this work provides new insights into the metabolic impact of HT and LUT on different BC cell subtypes, paving the way for a better understanding of the nutritional relevance of these phenolic compounds in the context of BC prevention and management.

Keywords: breast cancer; metabolism; hydroxytyrosol; luteolin; EVOO phenolic compounds

Citation: Garcia-Guasch, M.; Escrich, E.; Moral, R.; Duarte, I.F. Metabolomics Insights into the Differential Response of Breast Cancer Cells to the Phenolic Compounds Hydroxytyrosol and Luteolin. *Molecules* **2023**, *28*, 3886. <https://doi.org/10.3390/molecules28093886>

Academic Editors: Lorenzo Cecchi and Maria Bellumori

Received: 15 April 2023

Revised: 2 May 2023

Accepted: 3 May 2023

Published: 4 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common malignant tumour in women worldwide, displaying high incidence, prevalence, and mortality rates [1]. Among the several risk factors involved in BC pathogenesis, diet is an important environmental factor [2]. Higher adherence to the Mediterranean diet has been associated with a protective effect against several diseases, including BC [3]. The main source of lipids in the Mediterranean diet is olive oil, obtained from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.). In addition to lipids, of which monounsaturated fatty acids (MUFAs) represent the largest fraction, extra virgin olive oil contains more than 230 components from different chemical classes, including triterpenes, sterols, hydrocarbons, squalene, n-alkanes and n-alkenes, carotenoids, lipophilic phenols, hydrophilic phenols, and others [4]. Many of these components have been related to cancer prevention due to their antitumor effects, especially hydroxytyrosol, secoiridoids,

flavonoids, lignans, and triterpenes [5]. Hydroxytyrosol (HT) is a phenolic compound with a potential protective effect on BC, demonstrated both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* studies in several BC cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, T47D, and SKBR3 cells) have shown HT to have antiproliferative and pro-apoptotic properties, along with the capacity to arrest the cell cycle and inhibit cell migration and invasion [6–8]. In Sprague Dawley rats with experimental mammary tumours, HT also inhibited cell proliferation and tumour growth by altering the expression of proliferation and apoptosis-related genes [9]. Luteolin (LUT) is another phenolic compound, of the flavonoid subclass, that has shown anti-proliferative properties, inhibition of cell growth, promotion of cell cycle arrest, induction of pro-apoptotic protein expression, and inhibition of cell migration and invasion in BC cell lines [10,11]. *In vivo*, LUT reduced tumour burden and growth in an MDA-MB-231 xenograft model [12,13]. It also inhibited tumour growth and angiogenesis in experimental mammary tumours [14].

In previous works, we have reported a potential protective effect of extra virgin olive oil (EVOO) on experimental mammary cancer. In the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer model, animals fed a diet high in EVOO showed lower tumour incidence and yield, as well as a lower degree of morphological aggressiveness, in comparison to a high corn oil diet [14–16]. Subsequently, molecular analysis of experimental tumours revealed mechanistic differences, including in apoptosis, proliferation, and metabolism. In particular, the high-EVOO diet-induced altered expression of tumour proteins is known to be involved in several cell death pathways, suggesting a different balance in proliferation/apoptosis due to diet [17]. Moreover, animals fed the EVOO-rich diet showed modified glucose and mitochondrial metabolism when compared to animals fed the corn oil-enriched diet [18]. Interestingly, *in vitro* assays carried out in different human BC cell lines showed EVOO minor compounds (especially HT), and not fatty acids, to be largely responsible for the effects observed *in vivo* [18]. Hence, in the present work, we aimed to further dissect the impact of two EVOO phenols, HT and LUT, on BC cell metabolism.

Metabolic reprogramming is an important cancer hallmark, involved in many aspects of tumour initiation and progression [19]. The most emblematic oncogenesis-related metabolic alteration, known as the Warburg effect, consists of upregulated glycolytic activity and lactate production, even in aerobic conditions, to support increased energetic and biosynthetic needs [20,21]. Moreover, cancer cells typically present altered amino acid metabolism (such as increased glutaminolysis) and upregulation of one-carbon metabolism, together with increased lipid uptake, lipogenesis, and cholesterol synthesis [22]. Metabolic profiling of *in vitro* cultured cells, mainly using NMR- or MS-based metabolomics, represents an exquisitely valuable tool to study cell metabolism and its modulation with exogenous compounds, such as anti-cancer phytochemicals [23,24]. Previous studies have used metabolomics to investigate the metabolic responses of BC cells to polyphenols such as curcumin [25], soy isoflavones [26], and a panel of five compounds (quercetin, curcumin, tannic acid, genistein, and resveratrol) [27]. However, to the best of our knowledge, the metabolic effects of HT and LUT, two important constituents of extra virgin olive oil, on BC cells have been poorly studied.

In this work, an untargeted metabolomics approach based on ¹H NMR spectroscopy of cell extracts and culture medium supernatants was used to characterize the changes in BC cell metabolism induced with HT and LUT. Two cell lines, which represent distinct BC molecular subtypes, were used, namely the highly aggressive triple-negative (TNBC) MDA-MB-231 cells and the luminal A-like, hormone-responsive MCF-7 cells. The results are expected to contribute to an improved understanding of the role of nutritional factors on BC metabolism and pathogenesis.

2. Results

1. Cell Viability

The two phenolic compounds differentially affected the viability of the cell lines tested, as shown by the MTT results (Figure 1). In both cell lines, LUT decreased cell viability at lower concentrations than HT. For HT, the concentrations causing a 50% decrease in cell viability (IC50) were 142 μ M in MDA-MB-231 cells and 308 μ M in MCF-7 cells. For LUT, the IC50 values were 32 μ M in MDA-MB-231 cells and 15 μ M in MCF-7 cells. Thus, MDA-MB-231 were affected by HT at lower concentrations, whereas MCF-7 cells were more sensitive to LUT treatment. Based on these results, IC50 concentrations and their half values were selected for metabolomics studies.

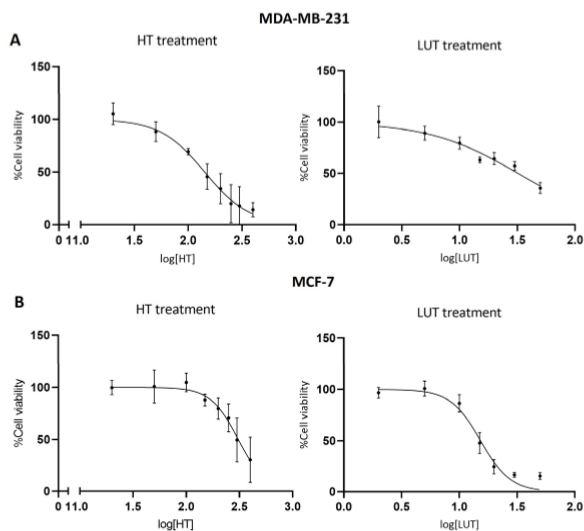


Figure 1. Viability of breast cancer cells upon 72 h treatment with different concentrations of HT or LUT, as assessed with an MTT assay. (A) Viability of MDA-MB-231 cells treated with HT (left) or LUT (right). (B) Viability of MCF-7 cells treated with HT (left) or LUT (right).

2.2. Extracellular Metabolic Profiling

For each cell type, ¹H NMR profiling of culture medium supernatants revealed the impact of treatment with the phenolic compounds on the cells' consumption and secretion patterns. Non-treated MDA-MB-231 cells used up pyruvate (80% consumed), glucose (61% consumed), and several amino acids (Figure 2A), among which serine was the most extensively consumed (50%), followed by glutamine (32%), methionine (23%), and BCAA (15–22%). Concomitantly, MDA-MB-231 cells secreted high amounts of lactate, alanine, glutamate, formate, glycerol, and branched-chain keto acids (BCKAs), namely α -ketoisocaproate (KIC), α -ketomethylvalerate (KMV), and α -ketoisovalerate (KIV). Treatment with HT mainly affected the consumption of serine (decreased in comparison to untreated controls) and the secretion of alanine (decreased), lactate, formate, and glycerol (increased) (Figure 2B and Supplementary Table S1). Moreover, glycine and acetate were newly secreted by HT-treated MDA-MB-231 cells. In regard to LUT, it induced MDA-MB-231 cells to decrease the consumption of glucose and some amino acids, as well as the secretion of alanine and glycerol. On the other hand, the release of acetate, formate, glycine, BCKA, and glutamate (at lower exposure concentrations) increased in LUT-treated MDA-MB-231 cells.

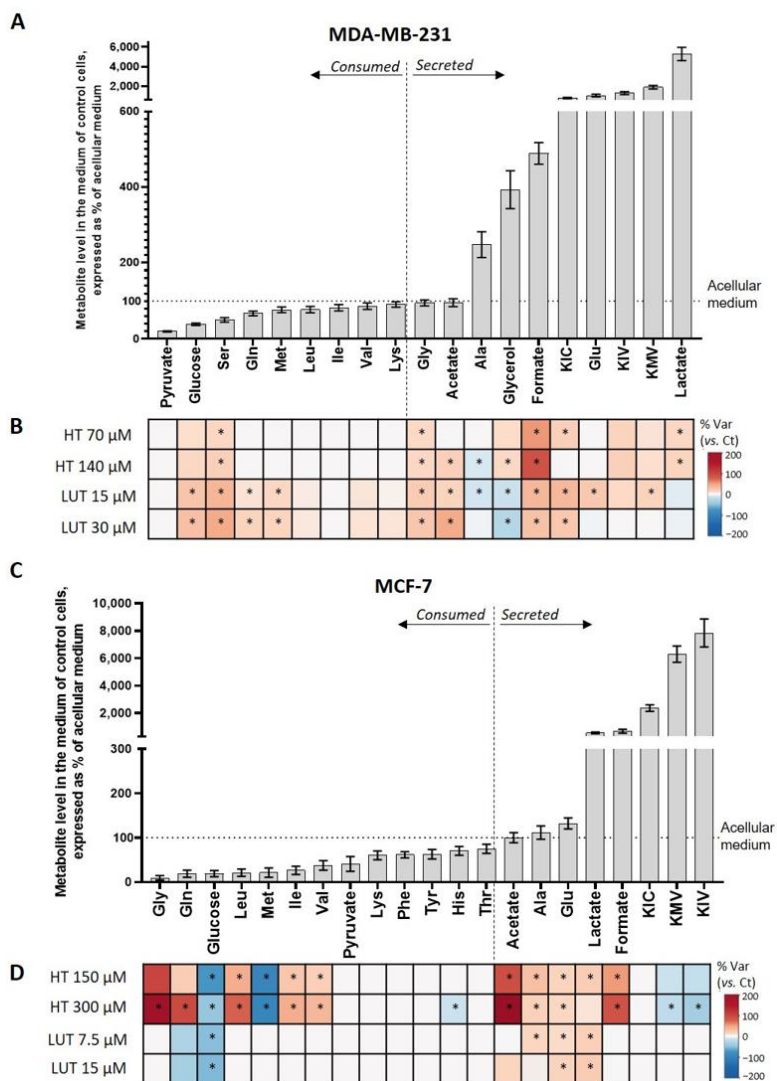


Figure 2. Metabolic profiling of culture medium. (A) Metabolites consumed and secreted by untreated MDA-MB-231 cells during 72 h in culture; the variations are expressed in relation to metabolite levels in an acellular medium (set to 100%, dashed line). (B) Heatmap coloured according to the % of the variation in MDA-MB-231 cells treated with HT (70 μ M and 140 μ M) or LUT (15 μ M and 30 μ M) in relation to untreated controls. (C) Metabolites consumed and secreted by untreated MCF-7 cells during 72 h in culture; the variations are expressed in relation to metabolite levels in an acellular medium (set to 100%, dashed line). (D) Heatmap coloured according to the % of the variation in MCF-7 cells treated with HT (150 μ M and 300 μ M) and LUT (7.5 μ M and 15 μ M) in relation to untreated controls. For metabolites consumed, the red colour represents higher levels in the medium, hence, lower consumption, while the blue colour represents lower levels in the medium, hence, increased consumption. For metabolites secreted, red and blue colours represent, respectively, higher and lower secretions. The colour intensity reflects the magnitude of consumption/excretion. Statistical significance was assessed with respect to controls using the *t*-test (* *p* < 0.05).

As for MCF-7 cells, their preferred substrates were glucose (81%), pyruvate (59%), and several amino acids (Figure 2C). Among those, glycine and glutamine were the most extensively consumed (91% and 81%) followed by methionine (79%) and the branched-chain amino acids (BCAAs) leucine (79%), isoleucine (74%), and valine (63%). On the other hand, BCKAs were secreted along with formate, lactate, glutamate, and alanine. Upon treatment with phenols, MCF-7 cells displayed several changes in extracellular metabolite levels (Figure 2D and Supplementary Table S2). In the presence of HT, they significantly increased the consumption of glucose, methionine, and histidine (these metabolites showed lower levels in the medium of treated vs. control cells), while using up less glycine, glutamine, and BCAAs (higher levels in treated vs. control media). In terms of secreted metabolites, HT-treated MCF-7 cells newly secreted acetate and increased the release of lactate, alanine, glutamate, and formate, whereas the secretion of KMV and KIV was reduced. Although less extensive than HT, LUT also altered the MCF-7 cells' extracellular profile (Figure 2D). Specifically, compared to untreated controls, the main changes were increased glucose consumption and increased secretion of lactate, alanine, and glutamate.

Overall, the two phenolic compounds significantly and differentially affected the exometabolome of MDA-MB-231 and MCF-7 cells. Interestingly, the metabolic activity of MDA-MB-231 cells appeared to be more extensively modulated by LUT, whereas HT had a greater impact on MCF-7 cells' exometabolome. Furthermore, the observed effects were highly dependent on the cell line. For instance, both phenols, especially LUT, decreased glucose consumption in MDA-MB-231 cells, whereas treated MCF-7 cells consumed more glucose and secreted more lactate, likely indicating a different impact on glycolysis, as discussed next.

2.3. Intracellular Metabolic Profiling

The first important observation is that the two cell lines presented markedly different intracellular profiles (Figure 3 and Supplementary Figure S1A). For instance, the intracellular levels of most amino acids (e.g., alanine, lysine, arginine, BCAAs, aromatic amino acids), creatine, phosphocreatine, and glutathione were significantly higher in MCF-7 than in MDA-MB-231 cells, while the latter presented increased relative abundances of lactate, PCho, *myo*-inositol, proline, and glycine.

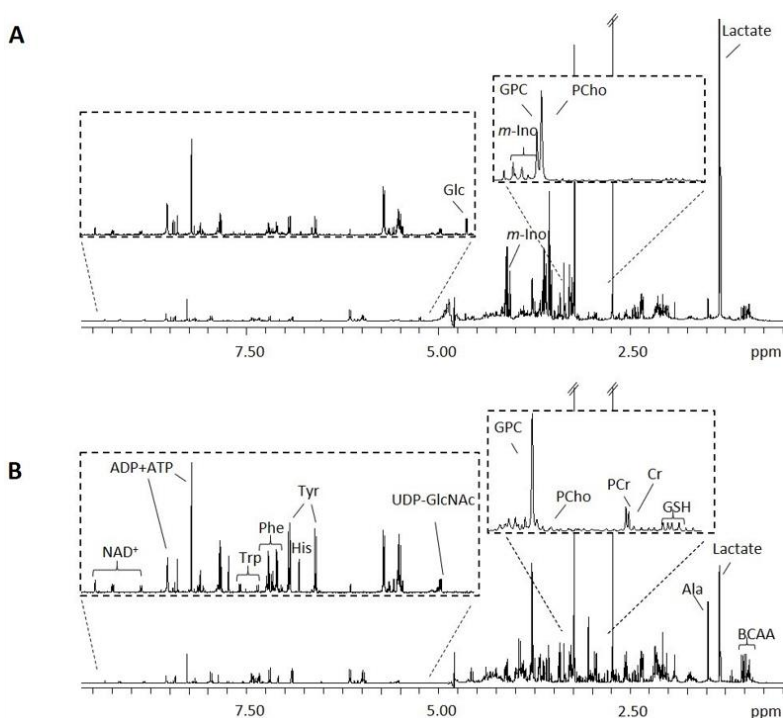


Figure 3. The 1D ¹H NMR spectra of polar extracts from (A) MDA-MB-231 cells and (B) MCF-7 cells. Three-letter codes used for amino acids; ATP/ADP, adenosine tri/di-phosphate; BCAAs, branched-chain amino acids; Cr, creatine; Glc, glucose; GPC, glycerophosphocholine; GSH, reduced glutathione; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; PCho, phosphocholine; PCr, phosphocreatine; UDP-GlcNAc, uridine diphosphate N-acetylglucosamine.

The influence of the two phenolic compounds on the intracellular metabolic composition of MDA-MB-231 and MCF-7 cells was first assessed with multivariate analysis of the ¹H NMR spectra recorded for cell polar extracts. In MDA-MB-231 cells, a principal component analysis (PCA) revealed a clear separation along PC1 (27% explained variance) between untreated controls (CTs) and the cells treated with LUT (Figure 4A). The separation between CT and HT-treated cells was less clear when the five groups were considered together; hence, each treatment was also analysed separately. The results, shown in Supplementary Figure S2A, indicate a dose-dependent separation from the CT for both phenols. A partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) confirmed this separation to be more robust for LUT than for HT (Q^2 0.669 vs. Q^2 0.478), reflecting the higher metabolic impact of LUT on the intracellular composition of MDA-MB-231 cells. The corresponding LV1 loading profiles (Supplementary Figure S2B) further revealed the main metabolites that varied in response to HT or LUT, corroborating the stronger impact of LUT and highlighting some differential effects between the two phenolic compounds.

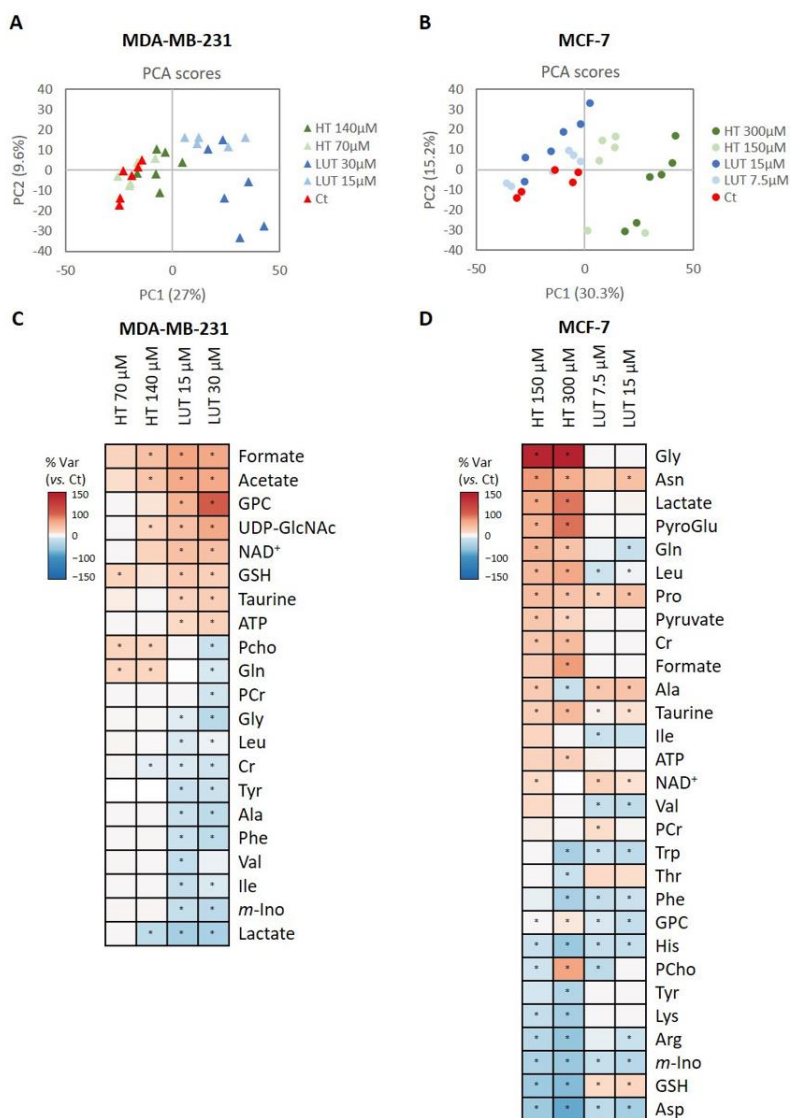


Figure 4. Metabolic profiling of cell polar extracts. (A,B) Score scatter plots obtained with a principal component analysis (PCA) of the spectral profiles obtained for MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. (C,D) Heatmaps of the metabolic variations induced by HT and LUT on intracellular metabolite levels of MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. The colour scale represents the % of the variation in relation to control cells (positive variations—red scale—for increased metabolites, and negative variations—blue scale—for decreased metabolites). Statistical significance was assessed with respect to controls using the t-test (* $p < 0.05$). Three-letter codes used for amino acids; ATP, adenosine triphosphate; Cho, choline; Cr, creatine; GPC, glycerophosphocholine; GSH,

reduced glutathione; *m*-Ino, *myo*-inositol; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; PCho, phosphocholine; PCr, phosphocreatine; UDP-GlcNAc, uridine diphosphate N-acetylglucosamine.

Contrarily to MDA-MB-231 cells, in the case of MCF-7 cells, the PCA separation of sample groups was clearer for HT-treated samples (Figure 4B). This result was validated with PLS-DA (Supplementary Figure S3A), as HT-treated cells were discriminated from CT samples with higher predictive power than LUT-treated cells (Q^2 0.572 vs. Q^2 0.356). Accordingly, the corresponding LV1 loading profiles (Supplementary Figure S3B) explaining HT effects were more intensely coloured than those relating to LUT effects.

To evaluate the magnitude of HT and LUT intracellular metabolic effects in more detail, the levels of individual metabolites (assessed with spectral integration) in the treated cells were measured in relation to their respective controls. The results are summarized as heatmaps in Figure 4C,D for MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively, while numerical variations are presented in Supplementary Tables S3 and S4. Regarding MDA-MB-231 cells (Figure 4C), only eight intracellular metabolites were significantly altered in response to HT, namely formate, acetate, uridine diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), glutathione (GSH), phosphocholine (PCho), and glutamine (increased) together with creatine (Cr) and lactate (decreased). As seen for the exometabolome, LUT had a stronger effect on the intracellular composition of this cell line, significantly affecting the levels of twenty-one metabolites. Formate, acetate, UDP-GlcNAc, glycerophosphocholine (GPC), GSH, taurine, NAD⁺, and ATP were increased, whereas lactate, PCho, *myo*-inositol, Cr, phosphocreatine (PCr) and several amino acids were decreased relative to control cells.

Regarding MCF-7 cells (Figure 4D), twenty-nine metabolites showed significantly different levels ($p < 0.05$) in HT-treated cells compared to untreated controls, while nineteen varied significantly due to LUT exposure. In particular, HT treatment increased the intracellular levels of lactate, pyruvate, formate, Cr, taurine, a number of amino acids (asparagine, glycine, glutamine, pyroglutamate, leucine, and proline), NAD⁺, and ATP while decreasing the levels of another set of amino acids (aspartate, arginine, lysine, threonine, aromatic amino acids, and histidine), GSH, and *myo*-inositol. Most of these changes increased in magnitude with HT concentration, whereas Ala, GPC, and PCho showed opposite variations at low and high HT doses. As for LUT-treated cells, the main variations compared to controls comprised increases in the levels of asparagine, proline, alanine, taurine, PCr, NAD⁺, and GSH, together with decreased levels of GPC, *myo*-inositol and amino acids such as aspartate, glutamine, BCAAs, and aromatic amino acids.

2.4. Lipid Composition

The ¹H NMR analysis of the cells' non-polar extracts allowed several lipid classes to be identified and their relative levels in the two cell lines to be compared. While the contents of total fatty acids (FAs) and phosphatidylcholine (PC) were similar, there were significant differences in the abundance of cholesterol (higher in MDA-MB-231), triacylglycerols (TAG), and phosphatidylethanolamine (PE) (higher in MCF-7), as shown in Supplementary Figure S1B. Moreover, MDA-MB-231 cells showed lower levels of unsaturated FAs (UFAs) but a higher relative proportion of polyunsaturated FAs (PUFAs).

Regarding the variations in treated vs. control cells, in MDA-MB-231 cells (Figure 5A), HT and LUT caused an increase in TAG and total FA, accompanied with decreases in PC and cholesterol. These changes were more prominent for LUT than for HT. Regarding the FA composition of these lipids, total UFAs decreased in treated cells, but the relative contribution of PUFAs to the pool of unsaturated FAs increased. In MCF-7 cells (Figure 5B), HT treatment induced a decrease in TAG and an increase in PC, together with an increase in the PUFA/UFA ratio, whereas LUT did not change these lipids. On the other hand, only LUT decreased cholesterol levels.

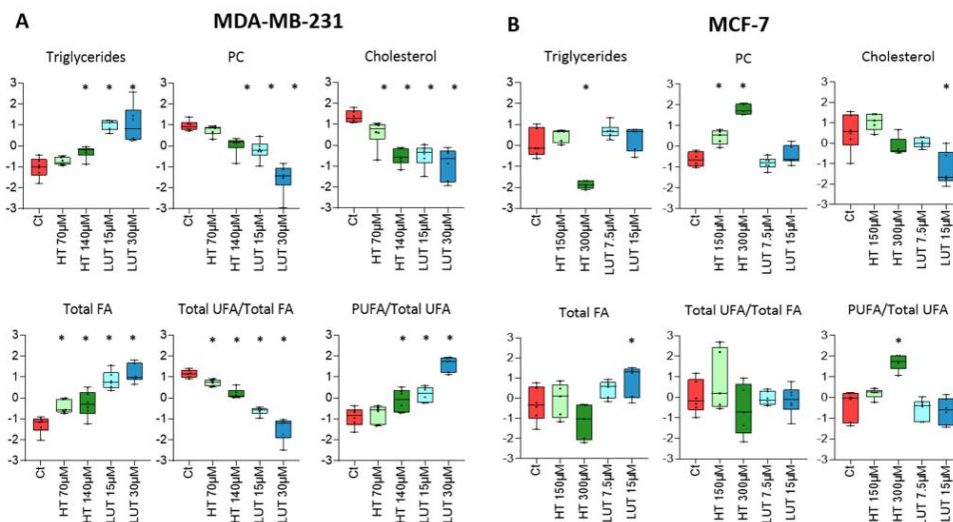


Figure 5. Metabolic profiling of cell non-polar extracts. (A,B) Relative levels of different lipid classes in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. Signal integrals were mean-centred and scaled to unit variance. Statistical significance was assessed with respect to controls using ANOVA (* $p < 0.05$). FAs, fatty acids; PC, phosphatidylcholine; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; UFAs, unsaturated fatty acids.

3. Discussion

In this work, we assessed the metabolic impact of two phenolic constituents of EVOO (HT and LUT) on BC cell lines representing different molecular subtypes and clinical features, namely, the highly invasive triple-negative MDA-MB-231 cells and the less aggressive luminal A-like MCF-7 cells.

The cell viability results showed that both phenolic compounds were cytotoxic to the tested BC cell lines, although to different extents. In particular, HT was found to affect cell viability at higher concentrations than LUT, implying a higher cytotoxicity for the latter. Moreover, the two cell lines were differentially sensitive to the phenols. In agreement with previous studies [7,28], HT was more cytotoxic to MDA-MB-231 than to MCF-7 cells (IC50 140 vs. 300 μM). On the other hand, LUT displayed higher cytotoxicity in MCF-7 than in MDA-MB-231 cells (IC50 15 vs. 30 μM), which is also in line with previous findings [10,11].

At the metabolic level, the two cell types also responded differently to treatment, as revealed with the integrated exo- and endometabolomics approach used herein. The main findings are summarized in Figure 6A,B for MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively, and discussed below.

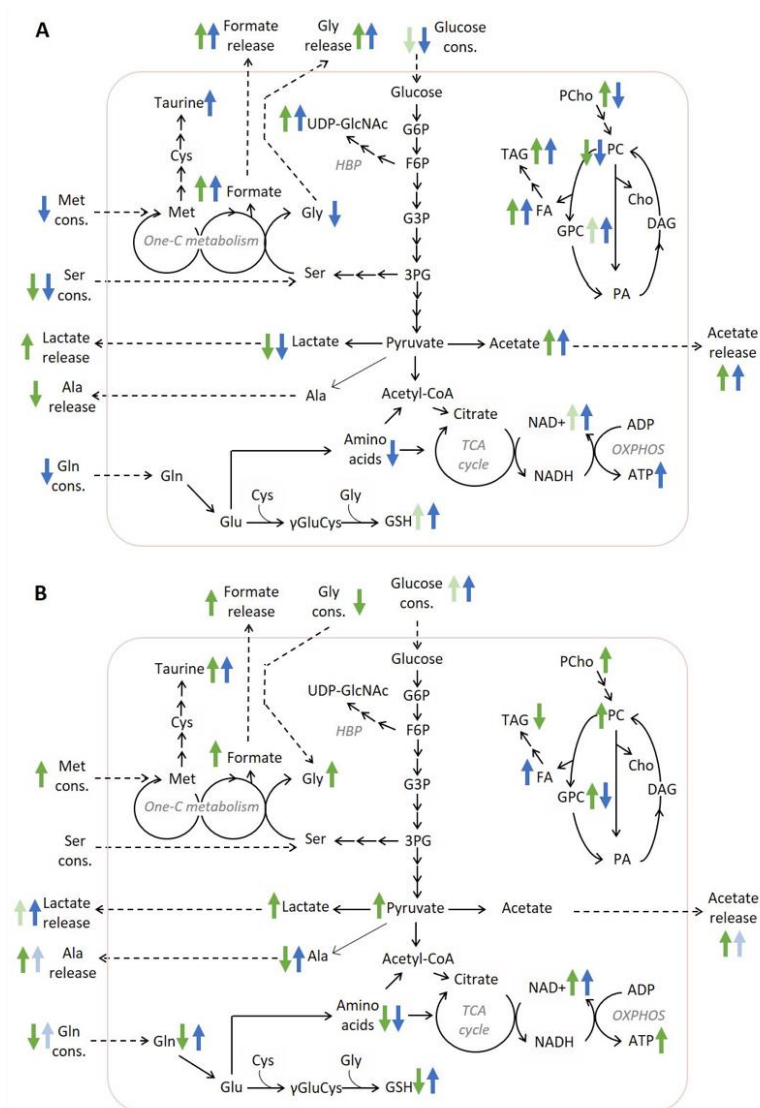


Figure 6. Schematic diagram showing the main metabolic responses of (A) MDA-MB-231 and (B) MCF-7 cells to HT (green arrows) and LUT (blue arrows) at the respective IC₅₀ concentrations. Changes that did not reach statistical significance in relation to controls ($p > 0.05$) are represented with lighter arrows.

In MDA-MB-231 cells, treatment with phenolic compounds decreased glucose consumption and intracellular lactate levels, which, in the case of LUT, was also accompanied by decreased lactate secretion, suggesting downregulation of glucose uptake and/or glycolytic turnover. These results agree with previous studies associating the anti-neoplastic activity of phenols with their ability to interfere with the high reliance of cancer cells on glycolysis (Warburg effect) [29,30]. One of the main mechanisms reported to be involved

is the inhibition of glucose uptake, mainly through decreased expression of the facilitative glucose transporter GLUT1. Indeed, LUT has been recently highlighted as one of the phenolic compounds with the strongest GLUT1 inhibitory activity in human embryonic kidney cells (HEK293T) that present stable expression of this receptor [31]. Moreover, some phenols such as curcumin, oroxylin A, and resveratrol were reported to directly interfere with glycolytic enzymes and glycolytic flux [29]. In the case of LUT (50 and 100 μM), a previous work has shown it to decrease lactate production in MCF-7 and 4T1 BC cells, but only when they were incubated under hypoxia, having no impact on the glycolytic flux under normoxic conditions [32]. As for HT, to our knowledge, its impact on glucose transport and metabolism has not been previously addressed in the literature. The intracellular accumulation of UDP-GlcNAc observed herein for treated MDA-MB-231 cells may also relate to glucose metabolism reprogramming, as it indicates the diversion of the glycolytic intermediate fructose-6-phosphate into the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). Indeed, UDP-GlcNAc is the end product of HBP and a key substrate for the glycosylation of proteins that regulate nutrient sensing and stress response [33].

Interestingly, the impact of the phenolic compounds on glucose metabolism was markedly different in MCF-7 cells compared to MDA-MB-231 cells. MCF-7 cells displayed higher glucose consumption, lactate secretion, and higher intracellular lactate levels (in the case of HT-treated cells), indicating an increase in glycolytic flux. According to our own results and the data of others [34–36], in basal conditions, MCF-7 cells tend to be less glycolytic than MDA-MB-231 cells, which may partially justify their differential regulation of glycolysis upon treatment with the phenols. A few other studies have also reported phenolic compounds such as Gossypol or Catechin to stimulate glucose uptake by MCF-7 cells [37,38], which is a response that may be viewed as an adaptive mechanism to oxidative stress [39].

Our results further indicate that both cell types upheld or intensified mitochondrial metabolism upon treatment with phenols. Indeed, when treated with HT or LUT, MDA-MB-231 and MCF-7 cells maintained extensive consumption of extracellular pyruvate and displayed unchanged or increased intracellular levels of ATP and NAD^+ (consumed in glycolysis and regenerated in oxidative phosphorylation—OXPHOS). Moreover, several intracellular amino acids were significantly depleted, possibly reflecting their use as anaplerotic substrates to fuel the TCA cycle. Despite several phenolic compounds being reported to interfere with electron transport chain complexes and act as mitochondrial uncouplers [40], a boost in mitochondrial respiration has also been observed in a few studies. For instance, in colon cancer cells, resveratrol downregulated glycolysis and stimulated OXPHOS, leading to increased ATP production [41,42]. A similar effect was reported in MDA-MB-231 cells treated with a eucalyptus bark extract [43]. Moreover, HT was recently reported to enhance the protein levels of respiratory chain complexes and ATP production in colorectal cancer cells [44].

Another interesting observation, common to the two cell lines, was the increase in acetate (intracellular and/or extracellular) in both HT- and LUT-treated cells, especially at the higher exposure concentrations. According to the seminal work by Liu et al. [45], acetate overflow may result from pyruvate through its non-enzymatic, ROS-mediated conversion or from the altered activity of keto acid dehydrogenases. In the context of the present work, it is plausible to speculate that polyphenol-induced ROS may be involved, although this hypothesis requires further investigation.

MDA-MB-231 cells treated with either HT or LUT and MCF-7 cells treated with HT additionally exhibited enhanced release and intracellular levels of formate. Based on the knowledge that formate overflow in cancer cells mainly results from serine catabolism in excess of one-carbon unit required for biosynthesis [46], this observation is consistent with decreased cell proliferation and, hence, reduced biosynthetic needs. Concordantly, MDA-MB-231 cells treated with these phenolic compounds consumed less serine and glutamine while secreting more glycine and formate. In the case of MCF-7 cells, glycine switched from being released to being consumed, likely due to the lower serine levels available in

the medium of these cells [46]. Consistent with lower proliferation, the consumption of glycine, as well as glutamine and BCAAs, decreased in HT-treated MCF-7 cells, while LUT had no significant impact. Interestingly, HT-treated MCF-7 cells significantly increased the consumption of methionine. This essential amino acid serves many important roles in cancer cells, such as participating in methylation reactions, contributing to the folate cycle (hence, one-carbon metabolism), fuelling the synthesis of polyamines, purines, and pyrimidines, and contributing to redox regulation by providing homocysteine as a substrate for the transsulfuration pathway involved in the synthesis of GSH [47]. Its specific role in the response of MCF-7 cells to HT warrants further investigation.

GSH represents a key endogenous antioxidant defence, with a crucial role in suppressing ROS and supporting tumour cell survival, namely in TNBC [48]. In the present work, GSH levels increased upon the treatment of MDA-MB-231 cells with HT or LUT and in MCF-7 cells exposed to LUT. These results agree with other studies reporting increased GSH synthesis and/or regeneration upon treatment of cancer and non-cancer cells with HT [49,50] or LUT [51]. Indeed, phenolic compounds are widely recognized for their ability to modulate oxidative stress in cancer cells, exhibiting either antioxidant or pro-oxidant activities depending on the conditions [52]. Notably, in HT-treated MCF-7 cells, GSH levels decreased compared to untreated controls, while its precursor amino acids glycine and glutamine were increased, suggesting downregulated GSH synthesis.

The analysis of cellular non-polar extracts provided additional insights into lipid metabolism. Treatment with HT or LUT resulted in increased levels of TAG and total FAs, as well as a decrease in PC content in MDA-MB-231 cells, with these changes being more pronounced for LUT. Moreover, LUT-treated cells exhibited accumulation of GPC and decreased PCho (detected in the polar extracts), together with lower glycerol release. Altogether, these variations suggest the breakdown of membrane glycerophospholipids and the incorporation of their fatty acids into neutral lipids (stored in cytosolic droplets). The build-up of lipid droplets (LDs) is a common adaptive response to cellular stress caused by redox imbalance, nutrient starvation, and other factors [53]. On the other hand, in MCF-7 cells, HT triggered the strongest changes in TAG and PC levels, and the results suggested degradation of lipid droplets in contrast to the response observed in MDA-MB-231 cells. Treatment with phenolic compounds further induced decreased cholesterol levels in both cell lines and changes in the proportion of unsaturated fatty acids, corroborating the impact on cell membrane composition.

4. Materials and Methods

1. Chemicals

Hydroxytyrosol (PHL80152), luteolin (L9283), dimethylsulfoxide (DMSO), methanol, chloroform, deuterium oxide (D₂O) containing 0.75% 3-(trimethylsilyl) propionic acid (TSP-d₄), and MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, thiazole blue) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco™ Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBS), insulin, and phosphate buffer saline (PBS) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Deuterium oxide 100% and deuterated chloroform containing 0.03% tetramethylsilane (TMS) were purchased from Cortecnet (Paris-Saclay, France).

2. Instrumentation

NMR spectra were acquired using a Bruker Avance III HD 500 NMR spectrometer (University of Aveiro, Portuguese NMR Network) operating at 500.13 MHz for ¹H observation and equipped with a 5 mm TXI probe.

3. Cell Culture

The human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Middlesex, UK). MDA-MB-231 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. MCF-7 cells were grown in EMEM, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 0,01 mg/mL of insulin. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂.

4. Viability Assay

Cell viability was determined with the colorimetric MTT assay, which measures the intracellular reduction of tetrazolium salts into purple formazan by viable cells [54]. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated with HT at 0, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, and 400 µM or with LUT at 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, and 50 µM for 72 h. All the solutions contained 0.2% of DMSO. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well for MDA-MB-231 and 6×10^3 cells/well for MCF-7 and incubated overnight. The cell culture medium was replaced with fresh media containing HT or LUT and incubated for 72 h. The MTT reagent was added to each well (10 µL/well of MTT solution at 5 mg/mL in PBS) and incubated for 2 h at 37 °C. Then, formazan crystals were solubilized in 100 µL of 100% DMSO and absorbances were read at 570 nm. Relative cell viability was calculated as the absorbance ratio of treated and control samples.

5. Cell Treatment for NMR Analysis

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded into 100 mm cell culture dishes at a density of 2×10^5 cells/mL with a complete medium and allowed to recover for 48 h. Then, the cell culture medium was replaced with media containing the phenolic compounds and incubated for 72 h. For treatments, MDA-MB-231 cells were incubated with HT at 0, 70, and 140 µM or LUT at 0, 15, and 30 µM. MCF-7 cells were incubated with HT at 0, 150, and 300 µM or LUT at 0, 7.5, and 15 µM. For all treatments, a culture medium without cells was placed under the same conditions. Three independent assays with duplicates were performed, giving a total of six replicate samples per condition and per cell type.

6. Sample Collection and Preparation for NMR Analysis

Medium samples and cell extracts were prepared as previously described [36]. Briefly, to precipitate medium proteins and retain the metabolites, cold methanol was added to medium samples (2:1 volume ratio), and the supernatant was recovered after 30 min at -20 °C followed by centrifugation (13,000× g, 20 min, 4 °C). After PBS washing, cells were recovered from the culture dishes by scraping in cold methanol, followed by the addition of chloroform and water (final volume ratios 1:1:0.7) and centrifugation (10,000× g, 15 min, 4 °C) to separate the polar and non-polar phases. Polar extracts and medium supernatants were then dried in a Speedvac concentrator (Thermo Fischer Scientific), while non-polar extracts were dried under a nitrogen stream. All samples were stored at -80 °C. For NMR analysis, medium samples and polar extracts were reconstituted in 600 µL of deuterated phosphate buffer (PBS 100 mM, pH 7.4) containing 0.1 mM TSP-d₄, and the organic phases were reconstituted in 600 µL deuterated chloroform containing 0.03% TMS. The samples (550 µL) were then transferred into 5 mm NMR tubes for analysis.

7. NMR Data Acquisition

Standard 1D ¹H spectra (Bruker pulse programs "noesypr1d" for aqueous extracts and "zg" for organic extracts) were recorded with a 7002.8 Hz spectral width, 32 k data points, a 2 s relaxation delay, and 512 scans. In addition, 2D ¹H–¹H total correlation spectra (TOCSY) and J-resolved spectra were also registered for selected samples to assist spectral assignment. Spectral processing was performed using Topspin 4.0.6 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) and comprised manual phasing, baseline correction, and signal calibration with the TSP/TMS signal (0 ppm). Signal assignment was based on matching

1D and 2D spectral information to reference spectra available in the Bruker database BBio-recode, as well as in Chenomx 9.0 (Edmonton, AB, Canada) and the HMDB Compound Reference Library [55].

4.8. Multivariate Analysis and Spectral Integration of NMR Spectra

Spectra were normalized by total area and data matrices were scaled to unit variance (UV) giving equal variance to all variables. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were applied to data using SIMCA-P 11.5 (Umetrics, Umeå, Sweden). The results were represented as score scatter plots, and the cross-validated explained variance (Q^2) was used to assess the robustness of the PLS-DA group discrimination.

To provide a quantitative measurement of metabolic variations, selected signals were integrated using Amix-Viewer 3.9.15 (Bruker Biospin) and normalized by total area. For each metabolite, the percentage of variation in the treated samples was calculated relative to controls, along with the effect size (ES) and statistical significance (p -value). Loadings profiles and heatmap figures were generated using the R software version 4.1.3 (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>) (accessed on 7 March 2023).

5. Study Limitations

This study was conducted using BC cell lines, which are simplified models that cannot completely replicate tumour heterogeneity or the complex cellular interactions and microenvironmental factors present *in vivo*. Another important limitation is that metabolomics provides a static snapshot of the metabolites present in the sample, which may not accurately reflect the dynamic changes that occur *in vivo*. Additionally, metabolomics does not provide information on the mechanisms that regulate metabolic pathways or the factors that drive metabolic reprogramming. Hence, future work should integrate metabolomics with other omics approaches, such as transcriptomics or proteomics, to provide more comprehensive insights into the underlying biological mechanisms for metabolic changes.

6. Conclusions

Integrated exo- and endometabolomics of BC cells cultured *in vitro* revealed extensive metabolic reprogramming upon treatment with the phenolic compounds HT and LUT at their respective IC₅₀ concentrations. In general, the metabolome of MDA-MB-231 cells was more significantly affected by LUT, whereas HT had a greater impact on the metabolic profile of MCF-7 cells. Furthermore, although some effects were shared between the two cell lines, others were markedly distinct, underscoring the significance of metabolic context in cancer metabolomics studies. Common effects included stimulation of mitochondrial metabolism (with NAD⁺ and ATP levels being increased or unaltered), acetate production (possibly from ROS-induced conversion of pyruvate) and formate overflow (likely reflecting one-carbon metabolism adaptation to lower biosynthetic needs). On the other hand, the modulation of glycolysis and lipid metabolism was clearly cell-type-dependent. In MDA-MB-231 cells, the phenol treatments appeared to inhibit glycolysis (promoting HBP) and stimulate the build-up of neutral lipids. In contrast, the results for treated MCF-7 cells suggested an upregulation in the glycolytic flux and, in the case of HT exposure, the breakdown of neutral lipids. Furthermore, in MCF-7 cells, HT induced specific effects such as upregulated methionine consumption and decreased intracellular levels of GSH, possibly indicating higher oxidative stress. Overall, the results of this study provide novel clues about the metabolic impact of HT and LUT on different BC cell subtypes, which can contribute to a better understanding of the nutritional relevance of these phenolic compounds in the context of BC prevention and management.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28093886/s1>, Figure S1. Heatmaps illustrating the levels of (A) intracellular polar metabolites and (B) lipids in MDA-MB-231 and in MCF-7 cells. Figure S2. Multivariate analysis of the spectral profiles from MDA-MB-231 cell polar extracts. Figure S3. Multivariate analysis of the spectral profiles from MCF-7 cell polar extracts. Table S1. Metabolite variations in the culture medium of MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT in relation to untreated controls. Table S2. Metabolite variations in the culture medium of MCF-7 cells treated with HT or LUT in relation to untreated controls. Table S3. Metabolite variations in the polar extracts of MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT in relation to untreated controls. Table S4. Metabolite variations in the polar extracts of MCF-7 cells treated with HT or LUT in relation to untreated controls.

Author Contributions: Conceptualization, I.F.D. and R.M.; methodology, I.F.D.; investigation, M.G.-G.; resources, E.E. and I.F.D.; writing—original draft preparation, M.G.-G.; writing—review and editing, M.G.-G., I.F.D., E.E., and R.M.; funding acquisition, I.F.D., E.E., and R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was developed in the scope of the project CICECO—Aveiro Institute of Materials (UIDB/50011/2020, UIDP/50011/2020 and LA/P/0006/2020), financed by national funds through the FCT/MEC (PIDDAC). The NMR spectrometer is part of the National NMR Network (PTNMR), partially supported by Infrastructure Project N^o 022161 (co-financed by FEDER through COMPETE 2020, POCI, and PORL and FCT through PIDDAC). This research was also funded by “Fundación Patrimonio Comunal Olivarero (FPCO)” (FPCO2008-165.396; FPCO2013-CF611.084); “Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente” (AAO2008-165.471); “Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español (OIAOE)” (OIP2009-CD165.646); and FPCO and OIAOE (FPCO-OIP2016-CF614.087).

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data supporting the reported results are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789.
2. Kotepui, M. Diet and risk of breast cancer. *Wspolczesna Onkol.* **2016**, *20*, 13–19.
3. Guasch-Ferré, M.; Willett, W.C. The Mediterranean diet and health: A comprehensive overview. *J. Intern. Med.* **2021**, *290*, 549–566.
4. Jimenez-Lopez, C.; Carpena, M.; Lourenço-Lopes, C.; Gallardo-Gomez, M.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods* **2020**, *9*, 1014.
5. Moral, R.; Escrich, E. Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. *Molecules* **2022**, *27*, 477.
6. Bouallagui, Z.; Han, J.; Isoda, H.; Sayadi, S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 179–184.
7. Han, J.; Talorete, T.P.N.; Yamada, P.; Isoda, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* **2009**, *59*, 45–53.
8. Sirianni, R.; Chimento, A.; De Luca, A.; Casaburi, I.; Rizza, P.; Onofrio, A.; Iacopetta, D.; Puoci, F.; Ando, S.; Maggolini, M.; et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 833–840.
9. Granados-Principal, S.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, C.; Camacho-Corencia, P.; Sanchez-Rovira, P.; Vera-Ramirez, L.; Ramirez-Tortosa, M. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of shrp4 in rat mammary tumours. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55* (Suppl. 1), 117–126.
10. Sui, J.Q.; Xie, K.P.; Xie, M.J. Inhibitory effect of luteolin on the proliferation of human breast cancer cell lines induced by epidermal growth factor. *Acta Physiol. Sin.* **2016**, *68*, 27–34.
11. Kim, M.J.; Woo, J.S.; Kwon, C.H.; Kim, J.H.; Kim, Y.K.; Kim, K.H. Luteolin induces apoptotic cell death through AIF nuclear translocation mediated by activation of ERK and p38 in human breast cancer cell lines. *Cell Biol. Int.* **2012**, *36*, 339–344.
12. Lee, E.J.; Oh, S.Y.; Sung, M.K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 4136–4143.

13. Sun, D.W.; Zhang, H.D.; Mao, L.; Mao, C.F.; Chen, W.; Cui, M.; Ma, R.; Cao, H.X.; Jing, C.W.; Wang, Z.; et al. Luteolin Inhibits Breast Cancer Development and Progression in Vitro and in Vivo by Suppressing Notch Signaling and Regulating MiRNAs. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *37*, 1693–1711.
14. Cook, M.T.; Mafuvadze, B.; Besch-Williford, C.; Ellersieck, M.R.; Goyette, S.; Hyder, S.M. Luteolin suppresses development of medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 825–832.
15. Escrich, E.; Solanas, M.; Moral, R.; Escrich, R. Modulatory Effects and Molecular Mechanisms of Olive Oil and Other Dietary Lipids in Breast Cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 813–830.
16. Escrich, R.; Costa, I.; Moreno, M.; Cubedo, M.; Vela, E.; Escrich, E.; Moral, R. A high-corn-oil diet strongly stimulates mammary carcinogenesis, while a high-extra-virgin-olive-oil diet has a weak effect, through changes in metabolism, immune system function and proliferation/apoptosis pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *64*, 218–227.
17. Escrich, E.; Solanas, M.; Moral, R. Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: Experimental approaches. *Cancer Treat. Res.* **2014**, *159*, 341–351.
18. Garcia-Guasch, M.; Medrano, M.; Costa, I.; Vela, E.; Grau, M.; Escrich, E.; Moral, R. Extra-Virgin Olive Oil and Its Minor Compounds Influence Apoptosis in Experimental Mammary Tumors and Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancers* **2022**, *14*, 905.
19. Garcia-Guasch, M.; Navarro, L.; Rivero, V.; Costa, I.; Escrich, E.; Moral, R. A high extra-virgin olive oil diet induces changes in metabolic pathways of experimental mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.* **2022**, *99*, 108833.
20. Pavlova, N.N.; Zhu, J.; Thompson, C.B. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab.* **2022**, *34*, 355–377.
21. Libert, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 287.
22. Martínez-Reyes, I.; Chandel, N.S. Cancer metabolism: Looking forward. *Nat. Rev. Cancer.* **2021**, *21*, 669–680.
23. Schiliro, C.; Firestein, B.L. Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells* **2021**, *10*, 1056.
24. Wishart, D.S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1819–1875.
25. Bayet-Robert, M.; Morvan, D. Metabolomics Reveals Metabolic Targets and Biphasic Responses in Breast Cancer Cells Treated by Curcumin Alone and in Association with Docetaxel. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57971.
26. Uifalean, A.; Schneider, S.; Gierok, P.; Ionescu, C.; Iuga, C.A.; Lalk, M. The Impact of Soy Isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Using a Global Metabolomic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1443.
27. Rushing, B.R.; Wiggs, A.; Molina, S.; Schroder, M.; Sumner, S. Metabolomics Analysis Reveals Novel Targets of Chemosensitizing Polyphenols and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4406.
28. Rosignoli, P.; Sepporta, M.V.; Fabiani, R. Function In vitro chemo-preventive activities of hydroxytyrosol: The main phenolic compound present in extra-virgin olive oil. *Food Funct.* **2016**, *7*, 301–307.
29. Guerra, A.R.; Duarte, M.F.; Duarte, I.F. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 10663–10685.
30. Keating, E.; Martel, F. Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Front. Nutr.* **2018**, *5*, 25.
31. Sun, Y.; Duan, X.; Wang, F.; Tan, H.; Hu, J.; Bai, W.; Wang, X.; Wang, B.; Hu, J. Inhibitory effects of flavonoids on glucose transporter 1 (GLUT1): From library screening to biological evaluation to structure-activity relationship. *Toxicology* **2023**, *488*, 153475.
32. Du, G.J.; Song, Z.H.; Lin, H.H.; Han, X.F.; Zhang, S.; Yang, Y.-M. Luteolin as a glycolysis inhibitor offers superior efficacy and lesser toxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 497–502.
33. Chiaradonna, F.; Ricciardiello, F.; Palorini, R. The nutrient-sensing hexosamine biosynthetic pathway as the hub of cancer metabolic rewiring. *Cells* **2018**, *7*, 53.
34. Lunetti, P.; Di Giacomo, M.; Vergara, D.; De Domenico, S.; Maffia, M.; Zara, V.; Capobianco, L.; Ferramosca, A. Metabolic reprogramming in breast cancer results in distinct mitochondrial bioenergetics between luminal and basal subtypes. *FEBS J.* **2019**, *286*, 688–709.
35. Zare, M.E. The rate of aerobic glycolysis is a pivotal regulator of tumor progression. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2021**, *1*, 523–531.
36. Dias, A.S.; Almeida, C.R.; Helguero, L.A. Metabolic Reprogramming of Breast Tumor-Educated Macrophages Revealed by NMR Metabolomics. *Cancers* **2023**, *15*, 1211.
37. Jaroszewski, J.; Kaplan, O.; Cohen, J. Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells: 31P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 170.
38. Azevedo, C.; Correia-Branco, A.; Araújo, J.R.; Guimaraes, J.T.; Keating, E.; Martel, F. The Chemopreventive Effect of the Dietary Compound Kaempferol on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line Is Dependent on Inhibition of Glucose Cellular Uptake The Chemopreventive Effect of the Dietary Compound Kaempferol on the MCF-7 Human Breast Cancer C. *Nutr. Cancer.* **2015**, *67*, 37–41.
39. Liemburg-Apers, D.C.; Willems, P.H.G.M.; Koopman, W.J.H.; Grefte, S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 1209–1226.
40. Stevens, J.F.; Revel, J.S. Mitochondria-Centric Review of Polyphenol. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29*, 1589–1611.
41. Saunier, E.; Antonio, S.; Regazzetti, A.; Auzeil, N.; Laprèvote, O.; Shay, J.W.; Coumou, X.; Barouki, R.; Benelli, C.; Huc, L.; et al. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6945.
42. Blanquer-rosselló, M.M.; Hernández-lópez, R.; Roca, P.; Oliver, J.; Valle, A. Biochimica et Biophysica Acta Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 431–440.
43. Guerra, Á.R.; Soares, B.I.G.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Duarte, M.F.; Duarte, I.F. Metabolic Effects of a Eucalyptus Bark Lipophilic Extract on Triple Negative Breast Cancer and Nontumor Breast Epithelial Cells. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 565–575.

44. Leo, M.; Muccillo, L.; Pranzini, E.; Barisciano, G.; Parri, M.; Lopatriello, G.; Carlomagno, M.; Santi, A.; Taddei, M.L.; Sabatino, L. Transcriptomic Analysis of Colorectal Cancer Cells Treated with Oil Production Waste Products (OPWPs) Reveals Enrichment of Pathways of Mitochondrial Functionality. *Cells* **2022**, *24*, 3992.
45. Liu, X.; Cooper, D.E.; Cluntun, A.A.; Warmoes, M.O.; Zhao, S.; Reid, M.A.; Liu, J.; Lund, P.J.; Lopes, M.; Garcia, B.A.; et al. Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals Article Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell* **2018**, *175*, 502–513.
46. Meiser, J.; Tumanov, S.; Maddocks, O.; Labuschagne, C.F.; Athineos, D.; Van Den Broek, N.; Mackay, G.M.; Gottlieb, E.; Blyth, K.; Vousden, K. Serine one-carbon catabolism with formate overflow. *Health Med.* **2016**, *2*, 1–10.
47. Sanderson, S.M.; Gao, X.; Dai, Z.; Locasale, J.W. Methionine metabolism in health and cancer: A nexus of diet and precision medicine. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *19*, 625–637.
48. Beatty, A.; Fink, L.S.; Singh, T.; Strigun, A.; Peter, E.; Ferrer, C.M.; Nicolas, E.; Cai, K.Q.; Moran, T.P.; Reginato, M.J.; et al. Metabolite profiling reveals the glutathione biosynthetic pathway as a therapeutic target in triple negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 264–275.
49. Zou, X.; Feng, Z.; Li, Y.; Wang, Y.; Werd, K.; Weber, P.; Fu, Y.; Liu, J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 994–1006.
50. Kouka, P.; Priftis, A.; Stagos, D.; Angelis, A.; Stathopoulos, P.; Xinos, N.; Skaltsounis, A.L.; Mamoulakis, C.; Tsatsakis, A.M.; Spandidos, D.A.; et al. Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek Olea europea variety in endothelial cells and myoblasts. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 703–712.
51. Kang, K.A.; Piao, M.J.; Ryu, Y.S.; Hyun, Y.J.; Park, J.E.; Shilnikova, K.; Zhen, A.X.; Kang, H.K.; Koh, Y.S.; Jeong, Y.J.; et al. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 1169–1178.
52. Slika, H.; Mansour, H.; Wehbe, N.; Nasser, S.A.; Iratni, R.; Nasrallah, G.; Shaito, A.; Ghaddar, T.; Kobeissy, F.; Eid, A.H. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112442.
53. Jarc, E.; Petan, T. Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J. Biol. Med.* **2019**, *92*, 435–452.
54. Twentymann, P.; Luscombe, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 279–285.
55. Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Marcu, A.; Guo, A.C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D608–D617.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Material

Metabolomics Insights into the Differential Response of Breast Cancer Cells to the Phenolic Compounds Hydroxytyrosol and Luteolin

Maite Garcia-Guasch ¹, Eduard Escrich ¹, Raquel Moral ^{1,*} and Iola F. Duarte ^{2,*}

¹ Physiology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain; mariateresa.garcia.guasch@uab.cat (M.G.-G.); eduard.escrich@uab.cat (E.E.)

² CICECO—Aveiro Institute of Materials, Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

* Correspondence: raquel.moral@uab.cat (R.M.); ioladuarte@ua.pt (I.F.D.)

Figures

Figure S1. Heatmaps illustrating the levels of (A) intracellular polar metabolites and (B) lipids in MDA-MB-231 and in MCF-7 cells.

Figure S2. Multivariate analysis of the spectral profiles from MDA-MB-231 cells polar extracts.

Figure S3. Multivariate analysis of the spectral profiles from MCF-7 cells polar extracts.

Tables

Table S1. Metabolite variations in the culture medium of MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls.

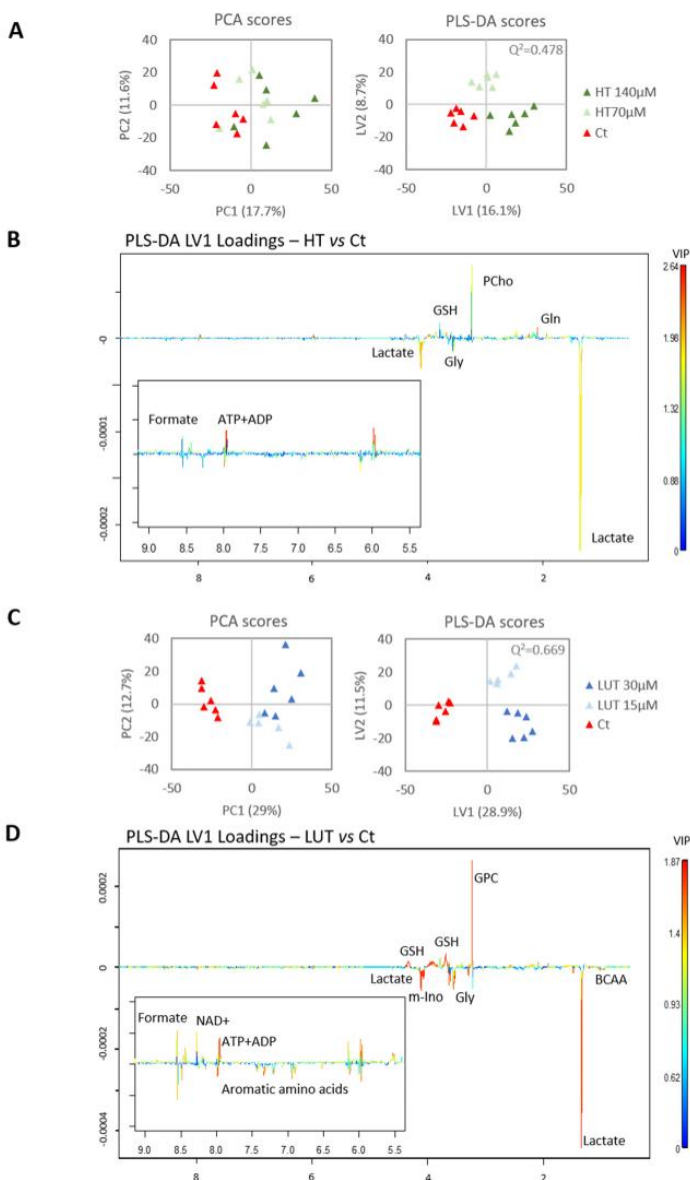
Table S2. Metabolite variations in the culture medium of MCF-7 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls.

Table S3. Metabolite variations in the polar extracts of MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls.

Table S4. Metabolite variations in the polar extracts of MCF-7 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls.

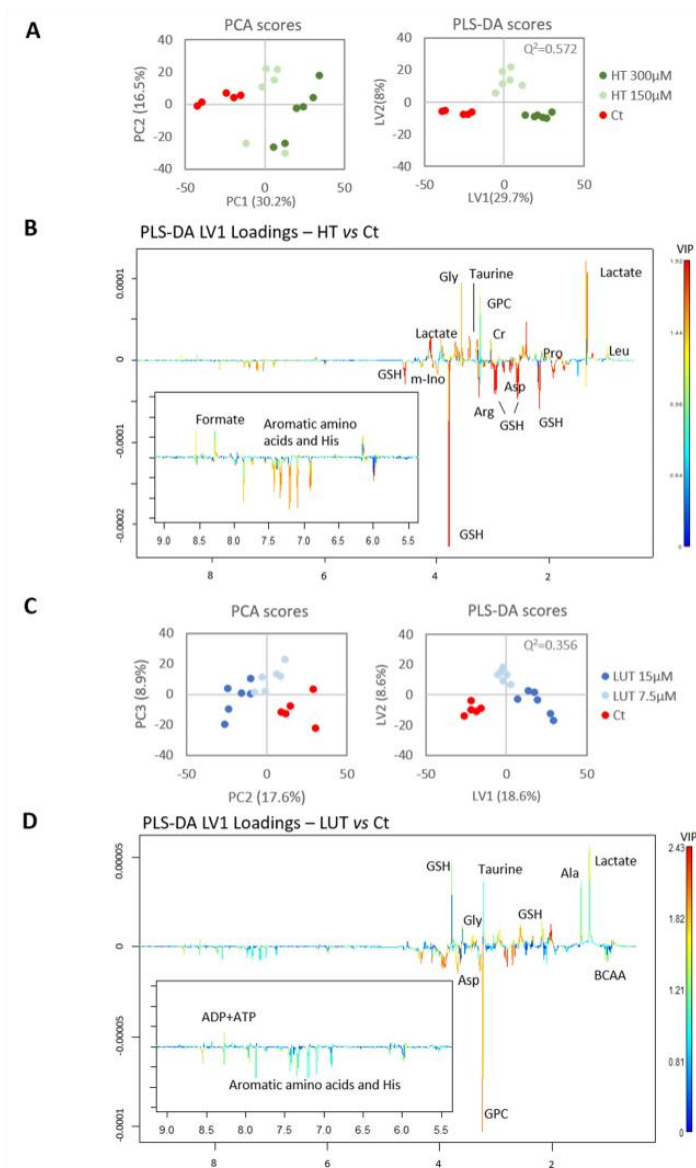
Resultats

Figure S2. Multivariate analysis of the spectral profiles from MDA-MB-231 cells polar extracts. **(A)** and **(C)** Scores scatter plots obtained by PCA (left) and PLS-DA (right) of cells treated with HT and LUT, respectively. **(B)** and **(D)** PLS-DA LV1 loadings plots colored according to variable importance to the projection (VIP), showing discriminant features for HT- and LUT-treated cells, respectively. Three-letter codes used for amino acids; ATP/ADP, adenosine tri/di-phosphate; BCAA, branched-chain amino acids; Cr, creatine; GPC, glycerophosphocholine; GSH, reduced glutathione; m-Ino, myo-inositol.



Resultats

Figure S3. Multivariate analysis of the spectral profiles from MCF-7 cells polar extracts. **(A)** and **(C)** Scores scatter plots obtained by PCA (left) and PLS-DA (right) of cells treated with HT and LUT, respectively. **(B)** and **(D)** PLS-DA LV1 loadings plots colored according to variable importance to the projection (VIP), showing discriminant features for HT- and LUT-treated cells, respectively. Three-letter codes used for amino acids; ATP/ADP, adenosine tri/di-phosphate; BCAA, branched-chain amino acids; GSH, reduced glutathione; m-Ino, myo-inositol; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; PCho, phosphocholine.



Resultats

Table S1. Metabolite variations in the culture medium of MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls. The values of % variation are those used to color-code the heatmap shown in Figure 2B.

		HT 70 μ M	HT 140 μ M	LUT 15 μ M	LUT 30 μ M
Acetate	% Var	0	17.74	16.45	44.35
	\pm		4.57	3.93	4.03
	ES		2.04	2.21	4.96
	p-value		7.90×10^{-3}	9.72×10^{-3}	1.81×10^{-5}
Ala	% Var		-8.87	-9.78	-6.23
	\pm		3.34	2.92	3.25
	ES		-1.59	-2.01	-1.12
	p-value		2.50×10^{-2}	1.30×10^{-2}	8.26×10^{-2}
Formate	% Var	54.17	93.33	31.67	27.78
	\pm	3.42	6.33	7.68	3.33
	ES	6.51	5.75	2.03	3.96
	p-value	8.96×10^{-7}	2.36×10^{-4}	1.76×10^{-2}	4.88×10^{-5}
Gln	% Var	0	0	7.77	14.10
	\pm			3.11	2.94
	ES			1.37	2.45
	p-value			4.29×10^{-2}	1.67×10^{-3}
Glu	% Var	0	0	20.18	0
	\pm			4.60	
	ES			2.28	
	p-value			9.04×10^{-3}	
Glucose	% Var	8.65	10.10	23.46	30.59
	\pm	5.40	4.34	3.88	4.24
	ES	0.85	1.26	3.09	3.57
	p-value	1.63×10^{-1}	7.60×10^{-2}	4.56×10^{-3}	5.56×10^{-4}
Gly	% Var	11.04	10.58	20.82	23.01
	\pm	1.58	1.65	1.89	1.62
	ES	3.90	3.47	5.72	7.24
	p-value	8.96×10^{-4}	8.94×10^{-4}	9.10×10^{-6}	5.03×10^{-6}
Glycerol	% Var	9.62	13.59	-12.05	-26.50
	\pm	5.06	5.36	4.45	4.80
	ES	0.99	1.36	-1.64	-3.79
	p-value	1.05×10^{-1}	4.58×10^{-2}	2.81×10^{-2}	7.86×10^{-4}
Ile	% Var	0	0	0	0
	\pm				
	ES				
	p-value				
KIC	% Var	16.67	0	32.38	23.02
	\pm	5.99		5.25	6.73
	ES	1.46		3.03	1.67
	p-value	3.71×10^{-2}		1.85×10^{-3}	1.43×10^{-2}

Resultats

		HT 70µM	HT 140µM	LUT 15µM	LUT 30µM
KIV	% Var	15.50	16.96	13.45	0
	±	7.84	8.63	7.29	
	ES	1.07	1.04	0.99	
	p-value	1.18x10 ⁻¹	1.11x10 ⁻¹	1.52x10 ⁻¹	
KMV	% Var	8.53	8.87	14.11	0
	±	5.34	5.13	4.77	
	ES	0.89	0.95	1.58	
	p-value	1.75x10 ⁻¹	1.53x10 ⁻¹	4.19x10 ⁻²	
Lactate	% Var	11.99	12.42	-7.96	-6.39
	±	2.76	2.91	4.86	3.36
	ES	2.28	2.30	-0.97	-1.08
	p-value	3.32x10 ⁻³	3.87x10 ⁻³	1.37x10 ⁻¹	8.04x10 ⁻²
Leu	% Var	0	0	6.97	7.50
	±			1.63	1.52
	ES			2.36	2.46
	p-value			6.45x10 ⁻³	1.76x10 ⁻³
Lys	% Var	0	0	6.16	7.60
	±			2.68	2.13
	ES		-0.66	1.27	1.85
	p-value			6.34x10 ⁻²	7.55x10 ⁻³
Met	% Var	0	0	11.91	15.52
	±			1.99	1.66
	ES			3.23	4.90
	p-value			4.78x10 ⁻⁴	3.66x10 ⁻⁵
Pyruvate	% Var	0	0	0	0
	±				
	ES				
	p-value				
Ser	% Var	11.11	18.18	36.80	44.30
	±	4.17	2.81	3.21	3.21
	ES	1.35	3.39	5.53	6.12
	p-value	3.34x10 ⁻²	1.72x10 ⁻³	1.21x10 ⁻⁵	1.72x10 ⁻⁶
Val	% Var	0	0	8.13	8.30
	±			1.71	1.55
	ES			2.61	2.71
	p-value			3.19x10 ⁻³	7.83x10 ⁻⁴

Resultats

Table S2. Metabolite variations in the culture medium of MCF-7 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls. The values of % variation are those used to color-code the heatmap shown in Figure 2D.

		HT 150 μ M	HT 300 μ M	LUT 7.5 μ M	LUT 15 μ M
Acetate	% Var	90.64	261.10	-5.20	13.88
	±	6.66	9.22	4.42	6.61
	ES	4.99	7.89	-0.64	1.05
	p-value	6.59x10 ⁻⁵	1.49x10 ⁻⁴	2.56x10 ⁻¹	8.76x10 ⁻²
Ala	% Var	30.97	19.88	11.59	6.48
	±	4.14	2.51	2.85	3.41
	ES	3.45	4.25	2.05	0.98
	p-value	8.15x10 ⁻⁴	3.94x10 ⁻⁴	6.70x10 ⁻³	1.13x10 ⁻¹
Formate	% Var	52.61	87.11	0	0
	±	10.89	9.40		
	ES	2.04	3.50		
	p-value	3.84x10 ⁻³	1.40x10 ⁻⁴		
Gln	% Var	19.63	96.26	-36.60	-32.09
	±	12.88	10.94	21.20	22.94
	ES	0.74	3.22	-1.13	-0.89
	p-value	2.12x10 ⁻¹	2.61x10 ⁻⁴	6.15x10 ⁻²	1.27x10 ⁻¹
Glu	% Var	13.67	11.60	11.04	10.64
	±	4.05	4.40	3.69	4.42
	ES	1.69	1.38	1.51	1.22
	p-value	1.03x10 ⁻²	3.41x10 ⁻²	1.99x10 ⁻²	4.55x10 ⁻²
Glucose	% Var	-73.04	-46.62	-55.30	-52.39
	±	17.85	16.07	17.83	17.18
	ES	-3.43	-1.91	-2.28	-2.20
	p-value	1.14x10 ⁻³	7.07x10 ⁻³	2.72x10 ⁻³	3.69x10 ⁻³
Gly	% Var	102.22	217.33	0	0
	±	33.15	11.00		
	ES	1.09	5.19		
	p-value	8.28x10 ⁻²	1.16x10 ⁻⁵		
His	% Var	0	-13.22	0	0
	±		2.97		
	ES		-2.64		
	p-value		1.26x10 ⁻³		
Ile	% Var	24.29	41.67	0	0
	±	8.83	9.02		
	ES	1.31	2.04		
	p-value	4.61x10 ⁻²	4.67x10 ⁻³		
KIC	% Var	0	0	0	0
	±				
	ES				
	p-value				

Resultats

		HT 150µM	HT 300µM	LUT 7.5µM	LUT 15µM
KIV	% Var	-18.41	-37.76	0	0
	±	11.30	12.50		
	ES	-0.96	-1.87		
	p-value	1.20x10 ⁻¹	9.19x10 ⁻³		
KMV	% Var	-13.43	-21.81	0	0
	±	7.73	8.04		
	ES	-0.99	-1.55		
	p-value	1.06x10 ⁻¹	2.00x10 ⁻²		
Lactate	% Var	20.13	8.26	18.07	20.82
	±	3.54	3.33	3.67	3.39
	ES	2.76	1.21	2.41	2.97
	p-value	7.98x10 ⁻⁴	5.63x10 ⁻²	1.61x10 ⁻³	7.06x10 ⁻⁴
Leu	% Var	41.48	74.41	0	0
	±	9.48	9.06		
	ES	1.93	3.14		
	p-value	1.41x10 ⁻²	6.74x10 ⁻⁴		
Lys	% Var	5.50	5.17	0	-5.28
	±	1.88	1.03		1.89585967
	ES	1.52	2.70		-1.525629128
	p-value	2.65x10 ⁻²	9.02x10 ⁻⁴		0.02509619
Met	% Var	-95.15	-95.24	0	0
	±	33.01	30.53		
	ES	-2.93	-2.76		
	p-value	2.45x10 ⁻³	2.43x10 ⁻³		
Phe	% Var	0	0	0	0
	±				
	ES				
	p-value				
Pyruvate	% Var	0	0	0	0
	±				
	ES				
	p-value				
Thr	% Var	0	0	0	0
	±				
	ES				
	p-value				
Tyr	% Var	0	0	0	0
	±				
	ES				
	p-value				
Val	% Var	18.27	31.61	0	0
	±	6.21	6.39		
	ES	1.44	2.24		
	p-value	3.78x10 ⁻²	3.24x10 ⁻³		

Resultats

Table S3. Metabolite variations in the polar extracts of MDA-MB-231 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls. The values of % variation are those used to color-code the heatmap shown in Figure 4C.

		HT 70 μ M	HT 140 μ M	LUT 15 μ M	LUT 30 μ M
Acetate	% Var	9.38	23.80	45.01	47.73
	\pm	4.40	5.92	5.15	4.93
	ES	1.07	1.91	4.06	4.43
	p-value	7.48×10^{-2}	5.68×10^{-3}	7.99×10^{-5}	3.44×10^{-5}
ADP+ATP	% Var	0	0	10.92	14.27
	\pm			2.61	3.43
	ES			2.22	2.27
	p-value			3.75×10^{-3}	7.11×10^{-3}
Ala	% Var	0	-4.61	-13.55	-18.68
	\pm			4.00	3.85
	ES			-2.06	-3.01
	p-value			8.45×10^{-3}	8.62×10^{-4}
Cr	% Var	0	-7.25	-8.68	-10.73
	\pm		3.18	3.43	4.49
	ES		-1.26	-1.40	-1.41
	p-value		4.52×10^{-2}	2.80×10^{-2}	3.60×10^{-2}
Formate	% Var	13.11	25.41	48.52	45.57
	\pm	5.64	6.01	5.86	6.23
	ES	1.11	2.00	3.61	3.27
	p-value	7.30×10^{-2}	5.25×10^{-3}	9.59×10^{-5}	1.92×10^{-4}
Gln	% Var	9.98	10.61	0	-12.92
	\pm	3.59	3.44		3.78
	ES	1.43	1.56		-1.93
	p-value	2.61×10^{-2}	1.64×10^{-2}		6.01×10^{-3}
Gly	% Var	3.65	-1.92	-7.61	-22.97
	\pm			1.91	2.98
	ES			-2.38	-5.11
	p-value			4.61×10^{-3}	2.87×10^{-4}
GPC	% Var	0	8.45	38.17	78.82
	\pm		3.81	4.92	7.07
	ES		1.14	3.89	4.96
	p-value		6.08×10^{-2}	7.30×10^{-4}	6.87×10^{-4}
GSH	% Var	13.67	8.31	19.04	16.93
	\pm	4.82	5.20	3.92	5.17
	ES	1.48	0.82	2.38	1.71
	p-value	2.65×10^{-2}	1.57×10^{-1}	1.74×10^{-3}	1.59×10^{-2}
Ile	% Var	4.43	0	-16.77	-11.38
	\pm			1.92	2.10
	ES			-4.83	-3.01
	p-value			6.40×10^{-5}	3.97×10^{-4}

Resultats

		HT 70µM	HT 140µM	LUT 15µM	LUT 30µM
Lactate	% Var	-4.98	-15.73	-36.08	-34.29
	±		4.82	4.75	5.04
	ES		-1.89	-4.69	-4.24
	p-value		6.20x10 ⁻³	4.12x10 ⁻⁵	3.77x10 ⁻⁵
Leu	% Var	3.54	0	-8.54	-6.26
	±			1.75	1.67
	ES			-2.66	-2.00
	p-value			9.80x10 ⁻⁴	5.67x10 ⁻³
m-Ino	% Var	2.48	-3.23	-17.11	-21.30
	±			2.63	3.17
	ES			-4.08	-4.38
	p-value			2.71x10 ⁻⁴	3.67x10 ⁻⁴
NAD+	% Var	0	14.74	28.00	30.11
	±		7.28	7.16	4.53
	ES		1.01	2.00	3.10
	p-value		9.36x10 ⁻²	1.08x10 ⁻²	3.06x10 ⁻⁴
Pcho	% Var	10.37	11.15	0	-13.06
	±	3.81	4.13		5.83
	ES	1.36	1.36		-1.33
	p-value	3.29x10 ⁻²	3.02x10 ⁻²		4.34x10 ⁻²
PCr	% Var	3.31	-3.89	-4.54	-9.94
	±				2.52
	ES				-2.44
	p-value				7.63x10 ⁻³
Phe	% Var	0	-4.06	-13.59	-16.15
	±			2.95	3.57
	ES			-2.76	-2.81
	p-value			1.15x10 ⁻³	1.97x10 ⁻³
Taurine	% Var	6.24	4.73	13.46	20.49
	±	3.69		3.95	4.11
	ES	0.97		1.91	2.72
	p-value	1.56x10 ⁻¹		2.25x10 ⁻²	5.96x10 ⁻³
Tyr	% Var	4.17	0	-10.89	-11.40
	±			3.17	2.92
	ES			-1.95	-2.18
	p-value			5.67x10 ⁻³	3.03x10 ⁻³
UDP-GlcNAC	% Var	0	14.72	28.15	46.04
	±		2.30	3.59	4.59
	ES		3.18	4.20	5.04
	p-value		5.45x10 ⁻⁴	1.36x10 ⁻³	8.46x10 ⁻⁴
Val	% Var	6.22	3.06	-15.53	-6.43
	±	2.42		1.85	1.91
	ES	1.43		-4.81	-1.89
	p-value	4.00x10 ⁻²		1.02x10 ⁻⁵	7.00x10 ⁻³

Resultats

Table S4. Metabolite variations in the polar extracts of MCF-7 cells treated with HT or LUT, in relation to untreated controls. The values of % variation are those used to color-code the heatmap shown in Figure 4D.

		HT 150 μ M	HT 300 μ M	LUT 7.5 μ M	LUT 15 μ M
ADP+ATP	% Var	13.04	17.85	5.44	0
	\pm	5.83	4.39	3.03	
	ES	1.07	1.92	0.95	
	p-value	8.03×10^{-2}	7.36×10^{-3}	1.15×10^{-1}	
Ala	% Var	21.10	-12.90	25.14	21.34
	\pm	4.66	4.93	4.45	4.42
	ES	2.27	-1.63	2.80	2.49
	p-value	3.46×10^{-3}	2.91×10^{-2}	1.15×10^{-3}	3.18×10^{-3}
Arg	% Var	-21.98	-48.50	-7.92	-11.58
	\pm	1.41	3.10	2.36	2.55
	ES	-9.91	-11.00	-1.81	-2.75
	p-value	8.83×10^{-8}	1.23×10^{-7}	9.72×10^{-3}	3.77×10^{-3}
Asn	% Var	52.59	42.59	14.81	28.44
	\pm	3.76	2.87	6.88	5.85
	ES	5.89	7.10	1.03	2.43
	p-value	1.79×10^{-6}	3.19×10^{-5}	8.62×10^{-2}	4.92×10^{-3}
Asp	% Var	-41.37	-63.80	-22.63	-36.29
	\pm	3.36	3.19	3.12	3.50
	ES	-8.63	-17.57	-4.47	-7.24
	p-value	6.91×10^{-8}	1.09×10^{-8}	1.71×10^{-5}	2.35×10^{-6}
Cr	% Var	22.59	33.00	0	0
	\pm	5.60	6.06		
	ES	1.85	2.36		
	p-value	9.03×10^{-3}	3.02×10^{-3}		
Formate	% Var	21.71	52.41	0	0
	\pm	11.04	12.64		
	ES	0.99	1.72		
	p-value	1.16×10^{-1}	1.09×10^{-2}		
Gln	% Var	37.66	26.95	-6.23	-15.47
	\pm	11.93	2.88	4.39	5.45
	ES	1.32	4.81	-0.81	-1.76
	p-value	4.33×10^{-2}	2.78×10^{-4}	1.76×10^{-1}	1.66×10^{-2}
Gly	% Var	134.15	138.47	0	0
	\pm	17.54	7.41		
	ES	2.24	5.66		
	p-value	5.19×10^{-3}	3.09×10^{-6}		
GPC	% Var	-8.42	7.59	-7.95	-16.13
	\pm	2.92	1.93	2.40	2.08
	ES	-1.60	2.11	-1.88	-4.83
	p-value	1.57×10^{-2}	5.17×10^{-3}	7.17×10^{-3}	5.25×10^{-5}

Resultats

		HT 150uM	HT 300uM	LUT 7.5uM	LUT 15uM
GSH	% Var	-39.93	-54.17	10	11.08
	±	3.00	3.53	1.42	2.17
	ES	-8.92	-11.36	3.79	2.76
	p-value	1.60x10 ⁻⁷	3.87x10 ⁻⁸	1.80x10 ⁻⁴	2.18x10 ⁻³
His	% Var	-9.90	-44.00	-15.16	-15.84
	±	4.29	4.47	4.95	4.11
	ES	-1.39	-7.86	-1.84	-2.39
	p-value	4.29x10 ⁻²	1.28x10 ⁻⁴	9.15x10 ⁻³	5.52x10 ⁻³
Ile	% Var	15.20	0	-13.64	-11.00
	±	7.27		4.97	5.26
	ES	1.00		-1.66	-1.26
	p-value	9.31x10 ⁻²		1.73x10 ⁻²	5.80x10 ⁻²
Lactate	% Var	44.18	66.72	0	0
	±	9.11	6.75		
	ES	2.07	3.97		
	p-value	4.00x10 ⁻²	5.03x10 ⁻⁵		
Leu	% Var	36.22	43.68	-11.65	-5.82
	±	1.24	3.44	2.45	2.01
	ES	12.79	5.17	-2.59	-1.70
	p-value	7.18x10 ⁻⁹	1.01x10 ⁻⁴	2.00x10 ⁻³	2.73x10 ⁻²
Lys	% Var	-17.17	-36.18	0	0
	±	5.09	5.62		
	ES	-2.19	-4.75		
	p-value	1.06x10 ⁻²	3.56x10 ⁻⁴		
m-Ino	% Var	-34.03	-43.24	-17.12	-17.57
	±	7.59	8.07	7.99	7.68
	ES	-3.28	-4.18	-1.33	-1.43
	p-value	2.56x10 ⁻³	8.67x10 ⁻⁴	4.65x10 ⁻²	4.03x10 ⁻²
NAD+	% Var	12.19	0	15.42	8.72
	±	3.11		3.07	2.01
	ES	1.89		2.37	2.37
	p-value	8.88x10 ⁻³		2.87x10 ⁻³	3.81x10 ⁻³
Pcho	% Var	0	48.66	-21.77	0
	±		4.68	1.95	
	ES		4.15	-7.09	
	p-value		2.68x10 ⁻⁴	9.93x10 ⁻⁷	
PCr	% Var	0	0	9.50	5.30
	±			1.73	2.31
	ES			3.01	1.28
	p-value			1.29x10 ⁻³	5.67x10 ⁻²
Phe	% Var	-6.71	-30.93	-16.47	-17.91
	±	4.42	4.31	4.34	4.21
	ES	-0.90	-5.26	-2.44	-2.67
	p-value	1.57x10 ⁻¹	7.83x10 ⁻⁴	6.04x10 ⁻³	4.62x10 ⁻³

Resultats

		HT 150uM	HT 300uM	LUT 7.5uM	LUT 15uM
Pro	% Var	29.95	20.41	14.05	28.24
	±	5.21	1.93	2.36	1.47
	ES	2.50	5.21	2.94	9.60
	p-value	3.10×10^{-3}	5.69×10^{-6}	4.18×10^{-4}	3.17×10^{-6}
PyroGlu	% Var	38.76	68.33	0	0
	±	7.00	5.68		
	ES	2.60	5.12		
	p-value	2.19×10^{-3}	1.19×10^{-4}		
Pyruvate	% Var	23.61	12.50	0	0
	±	4.36	3.73		
	ES	2.59	1.77		
	p-value	9.91×10^{-4}	1.42×10^{-2}		
Taurine	% Var	18.81	36.18	6.00	8.49
	±	2.21	1.96	1.72	1.59
	ES	4.08	8.19	1.89	2.92
	p-value	4.58×10^{-5}	1.61×10^{-7}	8.75×10^{-3}	1.19×10^{-3}
Thr	% Var	0	-13.67	9.58	11.40
	±		4.40	4.81	5.35
	ES		-1.88	1.02	1.15
	p-value		9.54×10^{-3}	9.11×10^{-2}	8.41×10^{-2}
Trp	% Var	0	-36.41	-13.59	-17.50
	±		5.20	5.57	5.20
	ES		-5.28	-1.48	-2.11
	p-value		5.33×10^{-4}	2.97×10^{-2}	8.49×10^{-3}
Tyr	% Var	-12.77	-28.66	0	0
	±	8.92	10.20		
	ES	-0.92	-1.95		
	p-value	1.83×10^{-1}	1.66×10^{-2}		
Val	% Var	11.60	0	-14.25	-14.12
	±	6.70		3.99	3.98
	ES	0.84		-2.21	-2.18
	p-value	1.47×10^{-1}		5.76×10^{-3}	6.47×10^{-3}



DISCUSSIÓ GLOBAL

Discussió global

Diferents estudis epidemiològics i experimentals han mostrat la influència dels factors nutricionals, i especialment dels lípids de la dieta, en el risc de desenvolupar càncer de mama. El principal factor que incideix en el risc d'aquesta malaltia és la quantitat de lípids, i diverses evidències mostren que les dietes amb alt contingut de greix (com per exemple les dietes occidentals), incrementen el risc d'alguns càncers, entre ells el de mama, en comparació amb dietes més baixes en greixos ¹⁹². A nivell experimental també està demostrat l'efecte estimulador de les dietes hiperlipídiques en la carcinogènesi mamària ¹⁹³. D'altra banda, per una mateixa quantitat de greix, existeix un efecte específic del tipus de lípid ^{50,194}. Breument, els estudis realitzats fins a l'actualitat han relacionat el consum de greixos saturats, trans, i PUFA n-6 amb un major risc de desenvolupar càncer de mama ^{44,195}. En canvi, el consum de PUFA n-3, així com la ratio PUFA n-3 / PUFA n-6, s'han relacionat amb un menor risc ¹⁰², mentre que els estudis del consum de MUFA no són concloents ¹⁹³. Tot i això, estudis epidemiològics en poblacions que segueixen la dieta mediterrània, el consum de MUFA s'ha relacionat amb un risc menor de desenvolupar la malaltia ⁴⁸. L'oli d'oliva és la principal font de greix de la dieta mediterrània, i està format majoritàriament per una fracció lipídica, composta majoritàriament per àcid oleic (MUFA n-9, fins al 85% de la composició, depenent de la varietat d'oli). A més a més, l'oli d'oliva verge presenta una fracció insaponificable amb varietat de compostos minoritaris, dels que s'han descrit més de 230 components de diferents classes químiques, alguns d'ells altament bioactius als quals s'ha atribuït diversos efectes beneficiosos per a la salut ⁵⁷.

L'**objectiu** principal d'aquest treball ha estat investigar l'**efecte dels lípids de la dieta en la carcinogènesi mamària experimental i en els mecanismes implicats**, així com dilucidar l'efecte que poden tenir alguns dels seus components principals. Per això s'han realitzat dos abordatges experimentals, *in vivo* i *in vitro*. D'una banda, l'estudi s'ha realitzat en mostres prèviament obtingudes en un **model de càncer de mama** induït amb DMBA en rates Sprague-Dawley. Les rates van ser alimentades amb tres tipus de dieta: control baixa en greix (3% d'oli de blat de moro), hiperlipídica de blat de moro (20% d'aquest oli, rica en PUFA n-6), i hiperlipídica d'oli d'oliva verge extra (3% d'oli de blat de moro i 17% d'OOVE, rica en MUFA n-9 i compostos bioactius). Les dues dietes hiperlipídiques eren isocalòriques però amb una composició d'àcids grassos i

Discussió global

compostos minoritaris diferent. La idoneïtat d'aquestes dietes per al desenvolupament i manteniment de la salut dels animals va ser prèviament validada^{55,196,197}. El grup control va rebre la dieta baixa en greixos durant tot l'experiment. Pel que fa als grups de dieta hiperlipídica, aquestes van ser administrades des del deslletament (grups iniciació+promoció) o a partir de la inducció amb el carcinogen (grups promoció). Administrant les dietes des del deslletament es va investigar si l'exposició a una alta quantitat de greixos des d'edats primerenques modificava la susceptibilitat de la glàndula mamària a ser transformada, i la posterior promoció d'aquestes cèl·lules. Amb els grups promoció es va investigar el diferent efecte de les dietes en la promoció tumoral de les glàndules ja induïdes. D'altra banda, els **estudis in vitro** van ser dissenyats per tal d'analitzar l'efecte de components individuals d'aquestes dietes: àcids grassos i compostos minoritaris de l'OOVE. Per això es van utilitzar dues línies cel·lulars representatives dels tipus moleculars de càncer de mama humà luminal A i triple negatiu.

Pel que fa al model experimental, resultats previs del grup van mostrar un efecte diferencial de les dues **dietes hiperlipídiques en el comportament clínic i l'agressivitat morfològica dels tumors** mamaris. Les característiques clíniques van ser analitzades mitjançant els paràmetres de la carcinogènesi: incidència (percentatge d'animals afectats, amb almenys un tumor), temps de latència (dies des de la inducció fins a l'aparició del primer tumor de l'animal afectat), contingut tumoral total (nombre total de tumors en el grup), i volum tumoral total (de tots els tumors del grup) (Annex 3). D'altra banda, es va realitzar un estudi anatomopatològic per valorar el grau histològic basat en el mètode utilitzat en els carcinomes de mama humans, adaptat a aquest model en rata pel grup d'investigació⁶⁷. Es va analitzar el grau arquitectural, grau nuclear, i nombre de mitosis en 10 camps de gran augment (400x). Es va investigar també altres paràmetres de malignitat morfològica, com la reacció estromal i la necrosi tumoral. L'anàlisi de tots aquests paràmetres va mostrar un clar efecte estimulador de la dieta hiperlipídica rica en PUFA n-6. Així, en tots els paràmetres es van trobar diferències significatives entre el grup control i els dos grups de dieta hiperlipídica de blat de moro, amb major nombre d'animals afectats, característiques clíniques de major malignitat (menys temps de latència, majors continguts i volums tumorals), i més grau de malignitat morfològica. D'altra banda, els grups de dieta hiperlipídica d'OOVE

Discussió global

van mostrar valors entremetjos, més semblants al grup control ¹⁹⁸. En el present estudi, es va ampliar l'anàlisi dels paràmetres de la carcinogènesi i de la caracterització morfològica, amb resultats que corroboraven l'efecte diferencial de les dues dietes hiperlipídiques. Així, el contingut tumoral mig (nombre de tumors per animal afectat del grup) va ser superior en el grup HCO respecte al LF. A més a més, la classificació del grau histològic en tres categories (SBR3), de forma anàloga a la categorització utilitzada en humans, va mostrar els mateixos resultats que l'estudi anatomopatològic adaptat a la rata (SBR11), indicant major agressivitat morfològica en els dos grups de dieta hiperlipídica PUFA n-6 en comparació amb el grup control, i també del grup "promoció" (LF-HCO) respecte a els dos grups de dieta d'OOVE. La categorització de les mitosis, i sobretot el nombre de mitosis, van mostrar també un efecte estimulador de la dieta rica en PUFA n-6 però no de la rica en OOVE.

A més a més, l'anàlisi dels tumors utilitzats en aquest estudi molecular va resultar en valors similars a l'estudi de tota la sèrie, indicant que les mostres analitzades eren representatives del grup experimental. Així, els tumors dels dos grups alimentats amb dieta rica en PUFA n-6 van mostrar els graus histopatològics més alts, indicant major agressivitat. A més, el volum dels tumors d'aquests grups (HCO i LF-HCO) també van ser significativament superior al dels tumors del grup control. Per contra, els tumors dels dos grups alimentats amb dieta rica en OOVE no van mostrar diferències significatives amb el grup control de dieta baixa en greixos.

L'efecte estimulador de la carcinogènesi de les dietes riques en PUFA n-6 està en concordança amb resultats obtinguts per altres autors en diferents models experimentals, però són molt pocs els treballs que han analitzat l'efecte l'oli d'oliva en la carcinogènesi ¹⁹³. En el model de carcinogènesi mamària induïda amb NMU s'ha descrit un efecte estimulador de les dietes riques en PUFA n-6 respecte a una dieta d'oli d'oliva ¹⁹⁹. A més, estudis més recents en un model experimental de ratolí transgènic que desenvolupa tumors mamaris espontanis, una dieta rica en PUFA n-3 d'origen marí va ser la que millor va mitigar els paràmetres clínics de carcinogènesi mamària, seguida d'una dieta al 10% d'oli d'oliva i una dieta al 10% de n-6 PUFA, la qual va mostrar els pitjors resultats ⁵². D'altra banda, molt pocs estudis han analitzat l'efecte de l'OOVE. En aquest sentit, una dieta normolipídica (4%) d'OOVE ha mostrat

Discussió global

un efecte protector en el model de carcinogènesi amb NMU, mentre que s'ha descrit que l'exposició prenatal i prepuberal d'una dieta amb un 7% d'OOVE, però no una amb un 15% d'aquest oli, té un efecte protector en la carcinogènesi induïda amb DMBA^{54,200}. Els nostres resultats indiquen un efecte clarament diferencial dels dos tipus d'oli, i mostren que la dieta rica en OOVE, malgrat ser hiperlipídica, té un dèbil efecte estimulador, la qual cosa suggereix que aquest oli pot tenir un efecte protector que contraresta, almenys en part, l'efecte estimulador que comporta el consum de gran quantitat de greixos.

D'altra banda, el rendiment de la carcinogènesi no depèn només de la quantitat i del tipus de greix consumit, sinó que també hi ha un efecte del període del desenvolupament en el qual es fa la intervenció dietètica. En aquest sentit, s'ha observat diferències en funció de si la dieta s'ha administrat des del deslletament o després de la inducció. En el cas dels grups alimentats amb dieta hiperlipídica PUFA n-6, el grup promoció (LF-HCO), va resultar en menys nombre de tumors que el grup iniciació (HCO), però de més volum i amb més grau de malignitat morfològica. D'altra banda, en els grups d'OOVE, l'administració de la dieta des del deslletament (grup HOO) va resultar en menor nombre de tumors i de menor grau de malignitat morfològica que el grup promoció (grup LF-HOO). Aquest efecte del "timing" d'exposició podria estar associat a diferents factors. L'administració d'una dieta rica en greixos, des del deslletament, pot influir en el desenvolupament de la glàndula mamària, tal com indiquen els estudis sobre el període de la pubertat, en els quals s'ha demostrat que aquestes dietes hiperlipídiques, especialment la de blat de moro, avança la maduració sexual⁷⁶. Aquesta acceleració modificaria el grau de diferenciació de la glàndula en el moment de la inducció amb el carcinogen, i per tant desplaçaria la finestra de susceptibilitat o període de major vulnerabilitat enfront d'un carcinogen. D'altra banda, s'ha demostrat que aquestes dietes poden modificar els enzims hepàtics d'activació i metabolització del carcinogen, de forma que la dieta d'OOVE podria evitar l'acumulació de metabòlits amb potencial mutagènic^{201,202}.

Diversos treballs han investigat els **mecanismes moleculars** pels quals els lípids de la dieta poden tenir un efecte en la carcinogènesi mamària. A la bibliografia s'han abordat diferents vies moleculars que afectin els trets característics o "hallmarks" el càncer de

Discussió global

mama. En aquest model experimental el grup ha descrit que l'efecte diferencial dels lípids de la dieta es donaria a través de múltiples mecanismes actuant de forma simultània i/o seqüencial, afectant funcions sistèmiques (creixement i maduració sexual, funció del sistema immune, metabolisme hepàtic), però també modificant el context molecular dels tumors. Estudis de transcriptòmica van mostrar un efecte d'aquestes dietes tant en la glàndula mamària com en els tumors experimentals que apunten a canvis en gens del metabolisme, proliferació i apoptosi¹⁰⁹. Aquests resultats van concordar amb estudis previs que suggerien diferent relació de l'equilibri proliferació/apoptosi en els tumors per efecte de les dietes²⁰³ però es desconeix el seu efecte en la reprogramació metabòlica, un dels principals "hallmarks" del càncer. A la literatura existeixen molt poques dades de l'efecte dels lípids de la dieta, i especialment de l'oli d'oliva, en el metabolisme tumoral.

L'estudi de l'efecte de les dietes hiperlipídiques en el **metabolisme tumoral** en el nostre model experimental de càncer de mama va revelar un efecte diferencial de les dietes en la modulació dels nivells d'expressió gènica, proteica i activitat enzimàtica dels enzims involucrats en les principals vies metabòliques.

La comparació dels grups alimentats amb les dietes hiperlipídiques (LF-HCO, HCO, LF-HOO i HOO) amb el grup control LF, va mostrar canvis en l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa en les mostres tumorals, per efectes d'ambdues dietes (glut1, g6pdh, pgd) o per la dieta hiperlipídica PUFA n-6 (hk2, pfk1, pfl), però aquests canvis no es van mantenir a nivell de proteïna o d'activitat enzimàtica. Els canvis observats a nivell d'mRNA poden no manifestar-se a nivell d'expressió proteica o activitat enzimàtica per diferents factors biològics, com modificacions postranscripcionals o postraduccional, o factors que controlen la traducció²⁰⁴. En la bibliografia s'ha descrit l'efecte de factors nutricionals en la regulació de l'expressió gènica. Aquesta regulació es pot donar de forma directa, unint-se als receptors nuclears (PPARs, LXR o RXR) o modulant altres factors de transcripció (SREBP i ChREBP), o de forma indirecta, actuant sobre vies de senyalització^{99,205,206}. Existeixen diverses evidències de què els lípids de la dieta poden afectar la regulació de gens en teixits com el fetge, però són més escassos els treballs que han abordat els seus efectes en teixit tumoral. Tal com s'ha comentat, estudis previs del grup van

Discussió global

descriure la capacitat de les dietes hiperlipídiques en modular els perfils d'expressió gènica en glàndula mamària i en els tumors experimentals, afectant l'expressió de gens relacionats amb el sistema immune, l'apoptosi, la proliferació i el metabolisme ^{109,198}.

En segon lloc, la comparació entre els grups de dieta hiperlipídica va mostrar diferències en funció del tipus de lípid. Així, la comparació dels grups en funció de tipus de greix (HCO vs. HOO i LF-HCO vs. LF-HOO) va revelar, en general, un increment dels nivells d'expressió gènica, proteica i activitat enzimàtica dels enzims involucrats en el metabolisme de la glucosa i el metabolisme mitocondrial en els tumors de les rates alimentades amb una dieta rica en OOVE (HOO i LF-HOO). Específicament, en comparar els grups que van rebre la dieta després de la inducció (LF-HCO vs. LF-HOO), la dieta d'OOVE va incrementar els nivells de proteïna involucrats en la captació de glucosa (Glut1), la glucòlisi (PFKL), el cicle de les pentoses fosfat (G6PDH, PGD), així com l'activitat de l'enzim del cicle de Krebs Citrat sintasa (CS). La comparació entre els grups que van rebre la dieta hiperlipídica des del deslletament (HCO vs. HOO), va mostrar que en el grup d'OOVE els tumors presentaven major expressió proteica d'UCP2 i major activitat enzimàtica de CS i IDH (enzims del cicle de Krebs). En definitiva, la dieta rica en OOVE va provocar canvis en el metabolisme tumoral, però depenent en el moment de la intervenció dietètica aquests canvis es van relacionar amb el metabolisme de la glucosa o el metabolisme mitocondrial, posant de manifest la importància del moment de la intervenció dietètica.

Pel que fa als resultats observats en el grup HOO, les dades presents a la literatura relacionen un increment de la glicòlisi i PPP amb un fenotip metabòlic típicament associat amb subtipus més agressius del càncer de mama ²⁰⁷. En un estudi, Cappelletti *et al.* van descriure que els tumors luminals B depenen energèticament dels àcids grassos i, en canvi, els subtipus Her2 i basals (subtipus més agressius), mostren alteracions principalment en la glucòlisi i el metabolisme de la glutamina ²⁰⁸. L'augment del metabolisme de la glucosa juntament amb l'efecte Warburg, són vies incrementades en el metabolisme de les cèl·lules tumorals. Aquests canvis, malgrat ser menys efectius en termes de producció d'ATP en comparació amb l'oxidació completa de la glucosa al mitocondri, proporciona a la cèl·lula intermediaris per a la biosíntesi de molècules o per al manteniment de l'homeòstasi en situacions d'estrès oxidatiu ¹⁴⁹.

Discussió global

L'increment en els nivells d'expressió dels enzims claus de la via de les pentoses fosfat (G6PDH i PGD), juntament amb el fet que no hi ha diferències entre les dues dietes en la lactat deshidrogenasa (efecte Warburg), suggereix la desviació de la glucòlisi cap a aquesta via. La via de les pentoses fosfat proporciona precursors per a la síntesi de nucleòtids i és també la principal font de NADPH cel·lular. Aquest NADPH participa en la regeneració dels sistemes antioxidants cel·lulars com per exemple, el glutatió ¹⁶³. En aquest sentit, el metabolisme tumoral es troba estretament lligat a altres vies de senyalització cel·lular com l'apoptosi i la resposta antioxidant. S'ha descrit que les cèl·lules tumorals tenen preferència per la isoforma més lenta de la piruvat quinasa, afavorint l'acumulació de fosfoenolpiruvat i, per tant, l'activació de la via de les pentoses fosfat ²⁰⁹. En el mateix sentit, l'enzim HK s'ha descrit com un punt clau en la regulació metabòlica de l'apoptosi. Quan l'enzim és actiu, es troba unit a la membrana mitocondrial evitant l'alliberació del citocrom c, i per tant, inhibint l'apoptosi ²¹⁰. Altrament, nivells elevats de NADPH resultants de l'activació de la PPP prevenen l'activació de l'apoptosi inhibint l'acció de les caspases, la funció de Bax i l'alliberament del citocrom c al citosol. Doncs, el NADPH pot representar un mecanisme important que relaciona el metabolisme cel·lular i la sensibilitat a l'apoptosi ²¹¹. Aquestes dades, juntament amb els paràmetres de malignitat discutits anteriorment, porten a la hipòtesi que les diferències causades per la dieta rica en OOVE en aquest model experimental poden estar representant canvis moleculars que reflecteixen respostes a l'estrès oxidatiu en lloc de representar un avantatge proliferatiu. De fet, les característiques de malignitat clínica i morfològica d'aquests tumors, inclòs el nombre de mitosis, són inferiors en aquest grup d'OOVE que els grups alimentats amb dieta rica en PUFA n-6. A més, resultats encara no publicats realitzats en aquests tumors indiquen menor activació de vies mitogèniques (com la de Ras-ERK-Akt, els nivells de Myc o de la ciclina D1) en els grups de dieta rica en OOVE respecte als grups de dieta rica en PUFA n-6.

En el cas de la dieta d'OOVE administrada després de la inducció (LF-HOO), els tumors van presentar un increment dels nivells d'UCP2, proteïna que desacobla la fosforilació oxidativa de la síntesi d'ATP, disminuint els nivells de ROS produïts al mitocondri ²¹². També s'ha observat un increment en l'activitat dels enzims del cicle de Krebs CS i IDH, i aquest últim enzim també contribueix als nivells cel·lulars de NADPH ¹⁶⁹. En les

Discussió global

cèl·lules tumorals, la reprogramació metabòlica per tal de sostenir el creixement descontrolat resulta en un increment dels nivells de ROS i un increment en vies relacionades amb la resposta antioxidant per escapar de l'apoptosi ¹⁴⁹. Tot i això, resultats previs del grup, no van veure clares diferències en els enzims i molècules responsables de la resposta cel·lular antioxidant en els tumors com per exemple, GSH, SOD, CAT o MnSOD per efecte del tipus de lípid de la dieta. Malgrat tot, sí que es va veure més dany en l'ADN relacionat amb ROS en els grups de dieta rica en PUFA n-6²¹³. D'altra banda, l'augment d'UCP2 concorda amb resultats previs quant a l'expressió hepàtica d'aquesta proteïna en els dos grups de dieta rica en OOVE ¹⁰⁹, així com en el descrit en altres teixits ²¹⁴. Malgrat que l'expressió d'UCP2 es relacioni amb l'evasió de l'apoptosi regulada per ROS, l'efecte dels nivells d'estrès oxidatiu cel·lular pot comportar diferents conseqüències depenent de les vies de senyalització activades o del context molecular. De forma general, les cèl·lules tumorals presenten nivells de ROS superiors a les cèl·lules no tumorals, ja sigui per l'acció dels oncogens, la pèrdua de supressors de tumors o per la sobre activació del metabolisme tumoral. Per exemple en la iniciació del tumor, nivells moderats de ROS promouen la proliferació cel·lular activant vies com PI3K/Akt/mTOR o MAPK/ERK ^{215,216}. Durant la progressió tumoral, ROS participa en processos d'angiogènesi, invasió i metàstasi. Tot i això, si els nivells de ROS assolits són excessius la cèl·lula tumoral, aturarà el cicle cel·lular o activarà els mecanismes de mort cel·lular programada. De fet, una estratègia terapèutica és l'ús d'antioxidants que actuen modificant els nivells de ROS cel·lulars, ja sigui incrementant-los per causar la mort cel·lular, o disminuint-los per tal de disminuir la proliferació ²¹⁷. De fet, l'efecte d'alguns antioxidants ha estat controvertit, ja que, com s'ha comentat, les respostes a ROS són complexes i depenen de múltiples factors, inclosos els tipus, nivells, localització i persistència de ROS, així com l'origen, l'entorn i l'estadi dels mateixos tumors ²¹⁶.

Totes aquestes evidències suggereixen que no es pot interpretar de forma aïllada la contribució de les vies metabòliques en la resposta antioxidant i associar-ho amb la malignitat tumoral. Per entendre l'efecte o la causa del fenotip metabòlic caldria integrar-lo dins del context molecular de la cèl·lula, coneixent l'estat de les vies de proliferació i/o d'apoptosi.

Discussió global

Per tal de completar l'estudi del metabolisme tumoral en el model experimental *in vivo* es va procedir a l'**anàlisi metabòlica** d'aquests tumors. La ressonància magnètica nuclear (RMN) és una eina analítica que permet l'estudi dels perfils metabòlics i la seva modulació amb compostos exògens com per exemple, components de la dieta ²¹⁸. La sensibilitat de la tècnica es troba en el rang del μM – mM , sensibilitat més baixa que altres espectroscòpies com per exemple, l'espectroscòpia de masses, però és altament reproducible i quantificable ²¹⁹. Per a la caracterització del perfil metabòlic es van obtenir les fraccions aquoses i lipídiques dels extractes tumorals. L'anàlisi de la **fracció aquosa** no va revelar diferències en la composició intracel·lular dels tumors per efecte de les dietes experimentals. El fet que el càncer de mama sigui una malaltia heterogènia i presenti molta variabilitat entre pacients i, fins i tot, dins de cada tumor individual, podria explicar aquests resultats ²²⁰. De fet, en un estudi on es va combinar l'estudi de l'expressió gènica per *microarrays* i HRMAS RMN (de l'anglès, *high-resolution magic angle spinning*) es va poder identificar tres subgrups de tumors amb diferent activitat glicolítica dins del subtipus de tumors luminal A ²²¹. Quan els estudis del metaboloma s'han dirigit a estudiar les diferències entre mostres tumorals i no tumorals, s'ha observat perfils metabòlics diferents, on s'ha observat un increment en metabòlits com la glicina, la taurina, la fosfocolina o el lactat en les mostres tumorals^{222,223}. Pel que fa a l'efecte de la dieta en el metaboloma, la metabòlica nutricional ofereix avantatges en l'avaluació d'aquesta relació, però s'han realitzat pocs estudis en aquest sentit i la majoria estudien potencials biomarcadors ²²⁴. Tanmateix, quant a la manca de diferències en els resultats d'aquest treball, no es poden descartar qüestions metodològiques, com el temps d'emmagatzemament de les mostres, que pot afectar especialment a alguns metabòlits.

D'altra banda, l'anàlisi multivariada de la **fracció lipídica** dels tumors va revelar la separació dels grups corresponents als animals alimentats amb dietes riques en oli de blat de moro dels grups alimentats amb dietes riques en oli d'oliva i grup control. La identificació de metabòlits i la posterior integració va revelar canvis en la composició lipídica dels tumors deguts a la dieta subministrada. Els tumors de les rates alimentades amb una dieta rica en oli de blat de moro (grups HCO i LF-HCO) van mostrar nivells superiors de PUFA, especialment àcid linoleic, en comparació amb els dels grups control i els dels grups d'oli d'oliva. En canvi, els tumors dels grups de dieta

Discussió global

rica en oli d'oliva (HOO i LF-HOO) van mostrar nivells superiors de MUFA en comparació als grups HCO i LF-HCOO. En definitiva, la composició lipídica dels tumors va mostrar similituds entre els dels grups de dieta rica en OOVE i el grup control, que es diferenciaven dels grups alimentats amb dieta rica en PUFA n-6 (HCO i LF-HCO), demostrant que la composició dels tumors es veu influenciada pels lípids de la dieta. Aquests resultats van en línia amb els descrits recentment per Hillyer i Hucik. En el seu treball en tumors experimentals, van descriure que els canvis en la composició lipídica dels fosfolípids de membrana depenien directament de la dieta subministrada i es relacionaven amb alguns paràmetres de malignitat. Concretament, els tumors dels animals alimentats amb una dieta que contenia un 10% d'oli d'oliva, van presentar els nivells més elevats d'àcid oleic i més disminuïts d'àcid linoleic en les membranes cel·lulars. A més, van presentar temps de latència majors i volum tumoral menors en comparació amb els animals alimentats amb una dieta que contenia un 10% de PUFA n-6 ⁵². Prèviament, altres treballs havien demostrat que els lípids de la dieta poden influenciar la composició de les membranes cel·lulars ^{96,97} i que aquests canvis poden modificar la regulació i el funcionament de diferents vies de senyalització cel·lular i intervenir en els processos carcinogènics ^{97,98}. A més, s'ha descrit que els PUFA n-6 són substrats per a la síntesi de metabòlits proinflamatoris ⁵¹. La composició lipídica de la membrana cel·lular i els seus canvis són de gran importància en la tumorigènesi, ja que, participen en diferents esdeveniments cel·lulars. Per tant, els canvis que alterin les proporcions de MUFA, PUFA i àcids grassos saturats intervenen en la supervivència cel·lular.

Per abordar l'efecte dels lípids de la dieta en un dels altres "hallmarks" essencials del càncer, es van analitzar els nivells d'expressió de les proteïnes de **diferents vies apoptòtiques**, inclòs la intrínseca, l'extrínseca, la induïda per estrès de reticle, i la caspasa independent. La comparació dels diferents grups experimentals va mostrar un increment de diverses proteïnes proapoptòtiques en els grups de dieta rica en OOVE, especialment en el grup LF-HOO, en comparació amb el grup control, i sobretot en comparació amb els grups de dieta rica en PUFA n-6, suggerint un efecte diferencial en l'apoptosi pel tipus de lípid. L'anàlisi de les proteïnes relacionades amb la via extrínseca va revelar un increment de l'expressió del receptor TNFR1 (LF-HOO vs. LF-HCO), tot i que no dels seus dominis TRADD i TRAF2, i també un increment del domini de mort

Discussió global

associat a Fas (FADD). En la mateixa línia, es va observar una tendència per a l'increment de l'expressió de la pro-caspasa 8, sense canvis significatius en la caspasa-8 activa. L'activació de la via extrínseca és regulada mitjançant receptors de mort transmembrana situats a la membrana plasmàtica. La cascada de senyalització apoptòtica comença amb la unió de lligand al seu receptor corresponent (TNF- α amb TNFR1, Fas-L amb Fas-R) ¹³³ i l'activació del domini intracel·lular que permet la unió dels dominis de mort intracel·lular. La procaspasa-8 pot unir-se ara als receptors activats amb les seves proteïnes adaptadores i ser activada ¹²⁹. D'altra banda, l'anàlisi de la via intrínseca va revelar un increment en els nivells d'expressió de proteïnes proapoptòtiques (Bid, Bak i Bax) en el grup LF-HOO en comparació LF-HCO, tot i que els nivells de citocrom c al citosol no van mostrar diferències per la dieta. La via intrínseca s'activa com a resposta a estímuls no mediat per receptors que produeixen senyals intracel·lulars iniciats en els mitocondris i que desencadenen la resposta de mort cel·lular ¹²⁹. La sortida del citocrom c al citosol es considera el principal esdeveniment activador de la via intrínseca i és facilitada pel conjunt de proteïnes proapoptòtiques (Bid, Bak i Bax) i inhibida per les proteïnes antiapoptòtiques (Bcl-2). Pel que fa a XIAP, un inhibidor de l'apoptosi, la dieta rica en OOVE ha mostrat un increment de la seva expressió proteica. Caspasa-3 és la proteïna clau en la confluència de les vies apoptòtiques. Els seus nivells no van mostrar una tendència clara, el que podria estar associat a inhibició per part de XIAP. Tot i això, s'ha observat una tendència en l'augment d'expressió de la caspasa-3 activa en aquest grup d'OOVE (LF-HOO vs. LF-HCO). Amb relació a la via independent de caspases, tot i que poques mostres van mostrar AIF actiu, el percentatge de tumors amb nivells citoplasmàtics detectables d'AIF actiu va ser significativament més gran en el grup LF-HOO. Tanmateix, es va veure un increment dels nivells d'expressió de la proteïna p53 en el grup LF-HOO en comparació LF-HCO. P53 és una proteïna supressora de tumors encarregada de regular el cicle cel·lular, l'apoptosi i l'estabilitat genòmica mitjançant diferents mecanismes. En les cèl·lules tumorals p53, es troba mutada o silenciada permetent a les cèl·lules escapar de la regulació del cicle i proliferar descontroladament. Pel que fa a la regulació de l'apoptosi, davant d'un estímul d'estrès cel·lular activa les proteïnes proapoptòtiques i inhibeix l'acció de les antiapoptòtiques afavorint la mort cel·lular ²²⁵. Hi ha pocs treballs *in vivo* que descriguin l'efecte d'una dieta rica en OOVE i l'apoptosi

Discussió global

en càncer de mama, però altres estudis han revelat que l'exposició prenatal a una dieta d'oli d'oliva del 7% o del 15% va donar lloc a un índex apoptòtic més alt en tumors induïts per DMBA ²²⁶. Stark *et al.* van descriure nivells més baixos de Bcl2, proteïna antiapoptòtica, i nivells més alts d'activitat proapoptòtica de Bak i Caspasa-3, en comparació amb els tumors d'animals alimentats amb la dieta d'oli de blat de moro ²²⁶. D'altra banda, hi ha pocs treballs que hagin abordat la capacitat dels àcids grassos per activar l'apoptosi en càncer. Alguns estudis *in vitro* han descrit, en cèl·lules de càncer de còlon, que els àcids grassos docosahexanoic (DHA) i eicosapentanoic (EPA), ambdós PUFA n-3 de cadena llarga, incrementen l'expressió de TNFR1. Aquest efecte es va observar només en una fase tardana de l'apoptosi, quan la maquinària proapoptòtica ja s'havia activat completament després d'inhibir dos reguladors claus (XIAP i FLIP), suggerint que es podia tractar d'un mecanisme de millora però no com l'esdeveniment principal per a l'activació de l'apoptosi ²²⁷. Respecte a l'àcid oleic, a la literatura no hi ha resultats conclouents. S'ha descrit un paper promotor d'aquest àcid gras en la proliferació de cèl·lules de càncer de pròstata ²²⁸, de càncer gàstric ²²⁹ i en model experimental de càncer cervical ²³⁰. D'altra banda, Storniolo *et al.* van descriure que en cèl·lules càncer de còlon, el tractament amb àcid oleic o àcid oleic juntament amb els polifenols de l'OOVE presentaven efectes contraris ²³¹. Tot i això, un estudi realitzat en la línia cel·lular de càncer de mama MCF-7 ha descrit un paper inhibidor de la proliferació ²³². En canvi, diversos estudis sí que han descrit un efecte proapoptòtic de diferent compostos minoritaris de l'OOVE ⁵³. Per exemple l'hidroxitirosol (HT) ha demostrat un efecte tant *in vivo* ⁶⁰ com *in vitro* ⁵⁹ on s'ha observat un increment de proteïnes relacionades amb la via intrínseca. Pel que fa a l'oleuropeïna (OLE), s'ha descrit un increment dels nivells d'expressió de Bax i p53, resultant també amb l'activació de la via intrínseca i l'apoptosi en les línies cel·lulars MCF-7 i MDA-MB-231 ^{58,61}. D'altra banda, també ha demostrat millorar l'apoptosi induïda per la quimioteràpia activant la via mitocondrial en un model animal de xenograf ⁶². Amb relació a la luteolina (LUT), s'ha descrit que pot activar l'apoptosi mitjançant la via extrínseca, intrínseca i per la via independent de caspases ²³³.

Donada la complexitat i heterogeneïtat dels tumors experimentals, on efectes subtils (com és l'esperable en un factor nutricional) es pot manifestar de forma variable en funció del substracte molecular, el conjunt de resultats observats *in vivo* pot ser més

Discussió global

informatiu que les dades de proteïnes específiques. En aquest sentit, la visió integrada dels resultats suggereix un ambient proapoptòtic en els tumors alimentats amb la dieta rica en OOVE, i subministrada amb la inducció del tumor (grup LF-HOO). Aquests resultats concorden amb la caracterització dels tumors descrita anteriorment, on es van obtenir tumors més petits i menys malignes en el grup LF-HOO en comparació el grup LF-HCO.

Tots el resultats obtinguts *in vivo* van portar a una altra fase del estudi, on es va utilitzar un altre abordatge experimental per tal d'aprofundir en els efectes de diferents components dels olis. Per això es van dissenyar **experiments *in vitro***, utilitzant dues línies representatives dels subtipus moleculars de **càncer de mama humà luminal A (MCF-7) i triple negatiu (MDA-MB-231)**, i van ser tractades amb àcid oleic i linoleic, i amb tres dels principals polifenols presents a l'OOVE (HT, OLE i LUT). Es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular, com a paràmetre associat a la proliferació cel·lular, així com anàlisis d'apoptosis mitjançant citometria de flux. Pel que fa a l'**efecte dels àcids grassos**, els resultats van mostrar un lleuger increment de la proliferació i disminució de l'apoptosi en les cèl·lules MDA-MB-231, i no es va observar cap efecte en les MCF-7, en línia amb el descrit en altres treballs ²³¹.

Amb relació al **tractament amb els polifenols**, l'HT va disminuir la viabilitat cel·lular, sent la línia cel·lular MDA-MB-231 més sensible a la seva acció que les cèl·lules MCF-7, tal com altres autors havien descrit ^{58,234}. En ambdues línies cel·lulars es va observar un increment de l'apoptosi a la concentració més alta (400 µM) i després de 48h de tractament. Els resultats concorden amb altres estudis que havien observat que el HT té la capacitat d'induir l'apoptosi ^{58,235}. El tractament amb OLE només va mostrar efectes després de 72h de tractament i a la concentració més alta (50 µM) en la línia MDA-MB-231, mentre que la línia MCF-7 va resultar més sensible mostrant disminució de la viabilitat a concentració més baixa (30 µM) i temps d'exposició més curts (48h), de manera similar al descrit sobre els efectes antiproliferatius de l'OLE ^{58,61}. Pel que fa a la LUT, en les condicions experimentals del primer assaig de viabilitat no es va observar una disminució de la viabilitat en cap de les dues línies cel·lulars. Considerant que a la bibliografia s'havia descrit un efecte de LUT sobre la viabilitat ^{236,237}, es van dissenyar nous experiments mantenint les mateixes concentracions però ajustant el %

Discussió global

de DMSO en el que es va dissoldre LUT. Els nous experiments van mostrar una disminució de la viabilitat cel·lular en ambdues línies cel·lulars, assolint la IC50 a concentracions de 15 μM en les MCF-7 i 30 μM en les MDA-MB-231. Altres estudis realitzats en cèl·lules tumorals de càncer de mama ja havien descrit concentracions d'IC50 entre 20-50 μM per als tractaments amb LUT ^{236,238,239}, mentre que pels tractaments amb HT només concentracions altes (300-400 μM) han mostrat efectes en la viabilitat ^{240,241}.

Els resultats *in vitro* amb àcids grassos i compostos minoritaris suggereixen que l'efecte beneficiós de l'OOVE seria degut, en gran part, pel paper dels seus polifenols, tal com alguns autors han suggerit en cèl·lules de càncer de còlon ²³¹. En aquest sentit, els models *in vitro* permeten aprofundir en l'efecte d'aquests compostos a escala molecular, i es van realitzar **estudis de metabolòmica** per tal de caracteritzar els seus efectes en els perfils metabòlics. Altres estudis han utilitzat la metabolòmica per investigar els efectes metabòlics de polifenols com la curcumina ²⁴², les isoflavones de la soja ²⁴³, la quercetina, la genisteïna o el resveratrol ²⁴⁴ en cèl·lules tumorals de càncer de mama, però els efectes de l'HT i la LUT, fins on sabem, no han estat estudiats. Determinar els efectes metabòlics d'aquests dos polifenols recolzaria el potencial de l'OOVE en la reprogramació metabòlica, i podria aportar noves dades sobre la importància del context molecular en la modulació de les vies de senyalització cel·lulars.

Així, es van fer servir les mateixes línies cel·lulars representatives del càncer de mama luminal A i triple negatiu (**MCF-7 i MDA-MB-231**) per elucidar l'efecte de l'hidroxitirosol i la luteolina en el metabolisme. Es van caracteritzar els perfils metabòlics a les concentracions que provocaven la reducció del 50% de la viabilitat, i a la meitat d'aquesta concentració. D'una banda, es va caracteritzar el metaboloma dels medis en què van ser cultivades aquestes cèl·lules, per tal de determinar l'exometaboloma, és a dir el perfil de metabòlits consumits i excretats. D'altra banda, es van analitzar les fraccions polars i apolars de les cèl·lules (endometaboloma). Totes aquestes anàlisis van servir per caracteritzar el metabolisme basal d'aquests tipus cel·lulars i per determinar posteriorment l'efecte dels tractaments amb els polifenols.

Discussió global

L'anàlisi integrada de l'exometaboloma i endometaboloma va indicar que els dos tipus cel·lulars van respondre de manera diferent al tractament, ja que es van observar canvis comuns i d'altres específics per al tipus de línia cel·lular. En primer lloc, **ambdós tipus cel·lulars** van mostrar canvis compatibles amb l'activació de la fosforilació oxidativa (OXPHOS), producció d'acetat i format (que podria ser causat pel desbordament metabòlic o en anglès, *metabolic overflow*) i composició de la membrana plasmàtica. En primer lloc, les cèl·lules tractades amb HT i LUT van mantenir l'elevat consum de piruvat extracel·lular, van mantenir o incrementar els nivells d'ATP i NAD+ i van mostrar una disminució dels nivells dels aminoàcids intracel·lulars, suggerint així la seva funció anapleròtica del cicle de l'àcid cítric. Aquests resultats concorden amb els efectes descrits per altres compostos fenòlics en cèl·lules de càncer de còlon i de càncer de mama, on s'ha observat un increment d'OXPHOS i dels nivells d'expressió de les proteïnes de la cadena de transport d'electrons ²⁴⁵⁻²⁴⁸.

En segon lloc, l'increment dels nivells d'acetat intracel·lular i/o extracel·lular observats en els dos tipus cel·lulars suggereix un increment de la seva producció i excreció. S'ha descrit que l'acetat es pot produir a partir del piruvat derivat de la glicòlisi mitjançant dues reaccions, una enzimàtica (activitat alterada de les deshidrogenases de cetoàcids) i una no-enzimàtica (mitjançant ROS) i ambdues es troben lligades a la funció mitocondrial. Per tant, en el context del treball presentat, la producció d'acetat vista en ambdues línies cel·lulars després del tractament amb els compostos fenòlics podria estar relacionada amb l'acumulació de ROS i el paper del piruvat com a neutralitzador d'aquestes espècies reactives ²⁴⁹. Altrament, també s'ha descrit que la secreció d'acetat podria ajudar a tamponar l'ambient àcid en què es troben les cèl·lules tumorals i atenuar així la transformació de les cèl·lules adjacents ¹⁷⁴. Les cèl·lules tumorals tenen la capacitat de modular el seu entorn, conegut com a microambient tumoral, per tal d'assegurar la seva supervivència. S'ha descrit que la secreció de lactat resultant de l'efecte Warburg provoca l'acidificació de l'entorn que, juntament amb altres mecanismes, afavoreixen la reprogramació metabòlica de les cèl·lules, com per exemple fibroblasts, assegurant el subministrament constant de nutrients i molècules anapleròtiques per tal de subsistir en condicions d'hipòxia ¹⁵⁷.

En tercer lloc, l'increment de format intracel·lular i/o extracel·lular es podria relacionar amb la reducció de la proliferació, ja que en les cèl·lules tumorals el format es produeix

Discussió global

per l'excés en el catabolisme de la serina. Altrament, les unitats de carboni alliberades serien utilitzades per a la biosíntesi de molècules ²⁵⁰. Per últim, el tractament amb ambdós polifenols va alterar la composició lipídica, la qual cosa és compatible amb canvis de la membrana plasmàtica, de forma més marcada en les MDA-MB-231, mostrant una disminució en els nivells de colesterol i canvis en la proporció d'àcids grassos insaturats. El colesterol és el principal esterol de les membranes de les cèl·lules animals i participa en el manteniment de la integritat estructural, la regulació de la fluïdesa de les membranes cel·lulars contribuint a l'homeodinàmica de diverses proteïnes de membrana a la superfície cel·lular i participa en la modulació de la transmissió de senyals ²⁵¹. La desregulació del contingut de colesterol de membrana i les propietats biofísiques relacionades en càncer és controvertida. Canvis en els nivells de colesterol alteren l'estructura dels *lipid rafts* o bales lipídiques modificant la transducció de senyals de vies involucrades en la proliferació o l'apoptosi, entre d'altres. En pacients amb un càncer de mama del subtipus basal, un increment de l'expressió de gens relacionats amb la síntesi del colesterol s'ha associat amb un pitjor pronòstic ²⁵². Altrament, s'ha observat que una membrana plasmàtica enriquida amb colesterol pot participar en el procés de resistència a teràpia, disminuint la permeabilitat de la membrana als químics. Al contrari, una disminució dels nivells de colesterol en la membrana plasmàtica facilita la deformació d'aquesta membrana, incrementant la capacitat d'invasió i metàstasi ²⁵³. Tot i això, les cèl·lules tumorals amb alta capacitat proliferativa necessiten nivells elevats de colesterol per tal d'assegurar la biosíntesi de membranes lipídiques. En el context dels nostres resultats, la disminució de colesterol podria relacionar-se amb la disminució de la viabilitat cel·lular més que amb la capacitat invasiva de les cèl·lules. A més a més, pel que fa als canvis en la saturació de la membrana, un alt contingut d'àcids grassos insaturats augmenta la seva susceptibilitat a la peroxidació lipídica ²⁵⁴, i la disminució de la proporció d'àcids grassos saturats en els resultats podria formar part d'una resposta adaptativa contra l'estrès oxidatiu causat pel tractament amb fenols. En la literatura, s'ha descrit que els polifenols tenen la capacitat d'alterar i modificar les propietats biofísiques de la membrana plasmàtica ²⁵⁵ però, fins on arriba el nostre coneixement, els efectes en cèl·lules tumorals encara no han sigut descrits. D'altra banda, els canvis en la

Discussió global

composició lipídica de les cèl·lules tumorals han mostrat intervenir en la proliferació i apoptosi ²⁵⁶.

Pel que fa als **canvis específics al tipus cel·lular**, el tractament amb HT i LUT va modular diferencialment la glicòlisi, el metabolisme lipídic i l'estat redox. En primer lloc, el tractament amb HT i LUT va disminuir la captació de glucosa i la glicòlisi en les cèl·lules MDA-MB-231. Resultats similars s'han descrit per altres compostos fenòlics en cèl·lules tumorals, on s'ha associat l'activitat antitumoral amb la capacitat d'interferir en el metabolisme de la glucosa ^{257,258}. Un dels principals mecanismes implicats és la inhibició de la captació de glucosa, principalment a través de la disminució de l'expressió del transportador GLUT1. A més, s'ha descrit que alguns polifenols com la curcumina, l'oroxilina A i el resveratrol interfereixen directament amb els enzims glicolítics i el flux glicolític ²⁵⁷. En el cas de la LUT s'ha destacat com un dels compostos fenòlics amb la capacitat inhibidora de GLUT1 més elevada ²⁵⁹. Respecte a l'HT, el seu impacte en el transport i el metabolisme de la glucosa no s'ha abordat prèviament a la literatura. Reforçant la idea de la capacitat d'ambdós fenols en modular el metabolisme de la glucosa en la línia cel·lular MDA-MB-231, es va observar una acumulació intracel·lular d'UDP-GlcNAc que indica la desviació de la fructosa-6-fosfat (intermediari de la glicòlisi) cap a la via de síntesi de la hexosamina (HBP, de l'anglès *Hexosamine biosynthetic pathway*). L'UDP-GlcNAc és el producte final d'aquesta via i és clau en la glicosilació de proteïnes que regulen la resposta a variació de nutrients o a l'estrès ²⁶⁰. Amb relació a les MCF-7, els nostres resultats han revelat que el tractament amb HT i LUT incrementa el flux glicolític. En aquest sentit, s'ha descrit que en la mateixa línia cel·lular el tractament amb gossipol i catequina ^{261,262} estimula la captació de glucosa com a mecanisme adaptatiu a l'estrès oxidatiu ²⁶³. Els efectes diferencials en la regulació del metabolisme de la glucosa poden estar influïts per les diferències metabòliques entre ambdues línies cel·lulars. L'exometaboloma de les cèl·lules sense tractar va revelar que en condicions basals la línia cel·lular MCF-7 tendeix a ser menys glicolítica que la MDA-MB-231, tal com han demostrat altres treballs ²⁶⁴⁻²⁶⁶. Les cèl·lules MCF-7 són cèl·lules no invasives, menys agressives i representatives del subtipus Luminal A. En l'àmbit metabòlic depenen de la fosforilació oxidativa per a la producció d'ATP i, per tant, és una línia cel·lular oxidativa. Al contrari, les MDA-MB-231 són invasives, més malignes i representen el subtipus triple negatiu

Discussió global

del càncer de mama. Depenen principalment de la glucòlisi aeròbica per a la producció d'ATP (no oxidatives), presentant un consum elevat de glucosa ²⁶⁵. Hi ha evidències que confirmen que les cèl·lules oxidatives (MCF-7) són més sensibles als canvis metabòlics que inclouen l'increment de l'efecte Warburg, com per exemple la hipòxia o l'alta disponibilitat de glucosa. En estudis on s'ha exposat diferents línies cel·lulars de càncer de mama a les condicions esmentades anteriorment, es va observar un increment de l'efecte Warburg i del metabolisme de la glucosa major en les línies oxidatives MCF-7 o T47D en comparació amb les línies no oxidatives MDA-MB-231 i MDA-MB-468 ²⁶⁷⁻²⁶⁹.

A més, el tractament amb HT i LUT va modular de forma diferencial l'estat redox en les dues línies cel·lulars. Ambdós polifenols van incrementar els nivells intracel·lulars de GSH en les cèl·lules MDA-MB-231. En canvi, en les cèl·lules MCF-7, l'efecte en els nivells de GSH depenia del compost fenòlic, ja que LUT va incrementar-ne els nivells, però HT va disminuir-los. El GSH és un antioxidant intracel·lular que actua com a regulador de l'estat redox protegint les cèl·lules del dany causat pels peròxids lipídics, per ROS, espècies reactives de nitrogen (NOS), etc. Canvis en els seus nivells es troben involucrats en l'inici i progressió tumoral, i en cèl·lules tumorals s'ha descrit que els seus nivells són més elevats que en cèl·lules no tumorals ²⁷⁰. Diferents estudis han descrit la capacitat dels polifenols en modular la resposta antioxidant, actuant com a antioxidants o com a prooxidants, depenent de les condicions ²⁷¹. De fet, estudis en cèl·lules de càncer de còlon, s'ha observat que la luteolina provoca l'apoptosi de les cèl·lules juntament amb un increment de la resposta antioxidant, incrementant els nivells de GSH ²⁷². Resultats semblants s'han descrit per l'HT, millorant la capacitat antioxidant de les cèl·lules tractades incrementant els nivells intracel·lulars de GSH ²⁷³.

El tractament amb els compostos fenòlics va provocar també diferents canvis del metabolisme lipídic en funció de la línia cel·lular. En les cèl·lules MDA-MB-231, el tractament amb els dos compostos fenòlics, sobretot LUT, va incrementar els nivells de triglicèrids (TAG) i d'àcids grassos totals (tFA) i va disminuir els nivells de fosfatidilcolina (PC), fosfocolina (PCho) i la secreció de glicerol. Aquests canvis suggereixen el trencament dels glicerofosfolípids de la membrana i el seu emmagatzematge en gotes lipídiques ²⁷⁴. Les gotes lipídiques protegeixen les cèl·lules

Discussió global

contra la lipotoxicitat mitgant la sobrecàrrega de lípids tant exògens com endògens, redueixen la lipotoxicitat dels lípids "lliures" no esterificats emmagatzemant-los en les seves formes esterificades menys oxidables. Aquesta estratègia forma part d'una resposta adaptativa comuna contra l'estrès cel·lular causat pel desequilibri redox, i la falta de nutrients, entre d'altres ²⁷⁵. Al contrari, en la línia MCF-7, el tractament amb els compostos fenòlics, especialment HT, va mostrar canvis en els triglicèrids i la fosfocolina suggerint la degradació de les gotes lipídiques.

En resum, l'estudi dels efectes metabòlics d'HT i LUT en les dues línies cel·lulars de càncer de mama va revelar una àmplia reprogramació metabòlica. Els efectes dels polifenols van ser dependents del subtipus cel·lular, suggerint novament la importància del context molecular en la reprogramació metabòlica per part dels components de la dieta. No obstant, els dos polifenols van mostrar efectes comuns en les dues línies cel·lulars com l'increment d'OXPPOS, descrit també per altres polifenols i la secreció d'acetat i format, suggerint un desbordament metabòlic ^{249,250}.

En general, els resultats d'aquest estudi proporcionen noves claus sobre l'impacte metabòlic de HT i LUT en diferents subtipus de càncer de mama, que poden contribuir a la comprensió de la importància nutricional d'aquests compostos fenòlics en el context de la prevenció i el tractament del càncer de mama. En aquest sentit, altres grups han descrit l'impacte d'altres polifenols presents a la dieta en el càncer de mama i altres càncers. Per exemple, diferents estudis han descrit que la curcumina, l'epigallocatequina-3-galat (ECGC), els licopens o la genisteïna, entre d'altres, promouen l'apoptosi i els canvis epigenètics en càncer de pulmó, de fetge, de pell o pròstata ²⁷⁶. Pel que fa als efectes metabòlics dels polifenols, s'ha descrit que el resveratrol disminueix la captació de glucosa a través de diferents mecanismes específics per cada tipus de càncer. Per exemple, en cèl·lules de càncer de pulmó el resveratrol inhibeix l'estabilització d'HIF1 α i conseqüentment, disminueixen els nivells de GLUT1. En canvi, en cèl·lules de càncer d'ovari, de limfoma o càncer hepàtic el resveratrol disminueix l'activació de les vies de senyalització Akt/mTOR o AMPK, provocant la disminució de la captació de glucosa ²⁷⁷. En un estudi de metabolòmica no dirigida, el tractament amb curcumina de les línies cel·lulars MCF-7 i MDA-MB-231 va mostrar efectes en el metabolisme de GSH i en el metabolisme lipídic, observacions semblants a les dels nostres resultats, que van suggerir que la curcumina induïa uns

Discussió global

nivells de ROS que sobrepassen les capacitats antioxidants cel·lulars dirigint a la cèl·lula cap a la senescència o a la mort cel·lular²⁴². En un estudi de metabolòmica molt recent, Rushing *et al.* van observar que el tractament de la línia cel·lular MDA-MB-231 amb polifenols, DHA i EPA (dos PUFA n-3) sensibilitzava a les cèl·lules tumorals als tractaments de quimioteràpia mitjançant la modulació del metabolisme. El tractament amb aquests compostos va modificar de forma diferencial el metabolisme d'un carboni i van concloure que la desregulació d'aquesta via, sigui augmentant-ne o disminuint-ne l'activitat, pot conduir a la quimiosensibilització cap al tractament amb doxorubicina²⁴⁴. Malgrat que en aquest treball no hem estudiat l'efecte dels polifenols juntament amb un agent quimioterapèutic, els resultats també han mostrat una modulació diferencial d'aquesta via per part de l'HT i la LUT suggerint respostes diferencials a l'estrès oxidatiu. Les cèl·lules canceroses equilibren acuradament el consum d'energia i les vies d'obtenció per mantenir una major proliferació i gestionar els nivells de ROS²⁷⁸. La interrupció d'aquest equilibri, reflectit en els canvis metabòlics observats, pot ser un mecanisme pel qual els polifenols causen la mort de cèl·lules tumorals i/o augmenten l'eficàcia quimioterapèutica. Finalment, i també en línia dels resultats observats, Uifalean *et al.* van descriure que les isoflavones de la soja disminueixen la captació de glucosa i el metabolisme de la glutamina en les línies tumorals de càncer de mama MCF-7 i MDA-MB-231²⁴³.

Discussió integrada

L'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar l'efecte dels lípids de la dieta en la carcinogènesi mamària experimental i en els mecanismes implicats, així com els efectes que poden tenir alguns dels seus components principals. Per això s'han realitzat dos abordatges experimentals, *in vivo* i *in vitro*.

L'estudi en el model experimental ha mostrat clarament un efecte sobre la carcinogènesi mamària de la quantitat i el tipus de lípid, així com del moment de la intervenció dietètica. L'anàlisi del grau d'agressivitat clínica i morfològica de la malaltia mostra un efecte clarament estimulador de la dieta rica en PUFA n-6, mentre que un excés d'OOVE té un efecte promotor feble¹⁹⁸. Els resultats suggereixen un potencial efecte beneficiós del OOVE que contraresta, al menys parcialment, el fet de subministrar una dieta hiperlipídica, i plantegen un efecte positiu si aquest oli és consumit en quantitats moderades. L'efecte de les dietes també són parcialment

Discussió global

diferents si aquestes són subministrades des d'edats primerenques o després de la pubertat, el que probablement està relacionat amb l'estat de diferenciació de les glàndules mamàries i altres factors sistèmics (enzims hepàtics de detoxificació) en el moment de l'exposició amb un agent carcinogènic ^{76,201}. En qualsevol cas els resultats aporten dades científiques sobre l'efecte beneficiós del consum de greixos saludables, com l'OOVE, tant des d'edats primerenques en relació al risc de futures malalties, com en la progressió de la malaltia cancerosa.

L'anàlisi de diferents mecanismes pels quals les dietes tindrien aquests efectes diferencials indiquen que aquests es donarien a múltiples nivells de manera simultània i/o seqüencial. Estudis previs suggereixen que la dieta rica en PUFA n-6 incrementa vies de proliferació en aquests tumors ¹⁹³. En el present treball els resultats suggereixen que el potencial efecte protector del OOVE es produiria per altres mecanismes, com l'apoptosi, i que en qualsevol cas l'equilibri proliferació/apoptosi també seria clarament diferent per efecte d'aquestes dues dietes. De forma paral·lela, la dieta rica en OOVE provocaria canvis en diverses vies metabòliques, tot i que aquests canvis no reflecteixen el grau de malignitat tumoral (no semblen ser marcadors de l'agressivitat de la malaltia), i per tant no es podrien interpretar de forma aïllada sense considerar la interrelació amb d'altres vies. De fet l'OOVE estimula vies metabòliques que s'han associat a malignitat, com l'increment de captació de glucosa i la glucòlisi, o l'augment de la via de les pentoses fosfat, malgrat que aquests tumors mostren característiques de menys malignitat. Una possibilitat és que aquest canvis estiguin relacionats amb la resposta antioxidant. Tot i que estudis previs no van mostrar clares diferències en marcadors d'estrès oxidatiu (glutatió oxidat/glutatió reduït, GSSG/GSH) en aquests tumors, els grups alimentats amb dieta rica en PUFA n-6 sí van mostrar nivells superiors de 8-oxo-dG, una lesió premutagènica associada al dany oxidatiu.

Així, especialment en el grup amb intervenció dietètica des del deslletament (HOO), l'OOVE va provocar un increment la captació de glucosa, de la glucòlisi, i de la via de les pentoses fosfat (PPP), que ha estat relacionat directament amb la capacitat de generar NADPH i millorar la resposta antioxidant. La via de les PPP és la principal font de generació del NADPH, molècula principal en la regeneració del glutatió ¹⁶⁶. S'ha descrit que en cèl·lules tumorals, l'increment de ROS participa en la regulació del metabolisme de la glucosa, estimulants l'efecte Warburg. Si els nivells de ROS o

Discussió global

l'exposició a nivells elevats a ROS són incrementats, les cèl·lules tumorals canvien el balanç metabòlic cap a la via de les PPP per tal d'incrementar la resposta antioxidant ²⁷⁹. En el cas que els nivells de ROS sobrepassin la capacitat antioxidant de la cèl·lula, s'activen vies de mort cel·lular programada com l'apoptosi ¹³⁰. Els resultats obtinguts són compatibles amb un augment de la capacitat antioxidant, que d'una banda podria evitar els efectes deleteris de ROS sobre la integritat de diverses biomolècules, però que també inhibiria l'activació de vies apoptòtiques. En aquest sentit, en el grup HOO no es va observar una activació significativa de vies apoptòtiques, i clínicament va presentar tumors més grans però de menys malignitat morfològica i amb menor agressivitat clínica de la malaltia.

D'altra banda, en el grup alimentat amb dieta rica en OOVE després de la inducció (LF-HOO), s'han observat canvis que suggereixen un ambient proapoptòtic, com l'augment de proteïnes relacionades amb la via extrínseca de l'apoptosi, que podrien estar relacionat amb canvis de la composició de la membrana plasmàtica, i també canvis en proteïnes relacionades amb la via intrínseca i caspasa independent, que podria estar relacionat amb l'efecte de compostos minoritaris d'aquest oli. A més, també es va observar un increment en l'expressió de p53, que regula diverses activitats clau de la cèl·lula, incloses l'apoptosi i el metabolisme. La forma salvatge (*wilde type*) afavoreix la fosforilació oxidativa (OXPHOS) a la glucòlisi inhibint la transcripció de gens com glut1, glut4 o g6pdh i activant gens relacionats amb la funció mitocondrial o l'oxidació d'àcids grassos, entre d'altres ²⁸⁰. La freqüència de la mutació de p53 en el càncer de mama depèn molt del subtipus, sent poc freqüent en tumors hormonodependents, tal i com són els d'aquest disseny experimental ²⁸¹¹⁵². Per tant, l'increment de p53 per part de l'OOVE podria estar modulant la reprogramació metabòlica tumoral i incrementant l'apoptosi en aquest grup de tumors, la qual cosa també coincidiria amb les característiques anatomopatològiques de menor malignitat així com amb la menor mida tumoral.

D'altra banda, els estudis de metabolòmica d'aquests tumors són compatibles amb que en la base de tots aquests efectes en vies metabòliques i apoptòtiques es trobarien canvis en la membrana plasmàtica, que com a conseqüència modules diferents vies de senyalització intracel·lular. Els canvis de composició lipídica en els tumors dels grups

Discussió global

alimentats amb dieta rica en oli de blat de moro (augment de PUFA n-6) també serien compatibles amb l'estimulació de vies proliferatives ¹⁹³, concordant a la seva vegada amb les característiques clíniques i morfològiques de major grau de malignitat d'aquests tumors. En qualsevol cas, aquests resultats demostren que la composició dels tumors es veu influenciada per la dieta, un fet de gran transcendència ja que mostra l'efecte directe d'un factor ambiental com és la dieta en la biologia del tumor. Així, les dietes podrien exercir un efecte més genèric, afectant la composició de les membranes plasmàtiques i dels seus microdominis en els tumors, la qual cosa podria influir en diferents vies i per tant manifestar-se de forma diversa en diferents cèl·lules inclús del mateix tumor. En aquest sentit, els estudis *in vitro* demostren que l'efecte de factors externs depèn en gran mesura del subtipus cel·lular. A més, més enllà d'un efecte general modificant la composició de les membranes plasmàtiques (o d'altres compartiments lipídics), els olis de la dieta podrien exercir accions més específiques, incidint en diferents vies. En qualsevol cas, i malgrat l'enorme heterogeneïtat cel·lular en els tumors *in vivo*, s'han observat tendències repetides per efecte de la dieta que suggereixen una influència variable però real en funció del tipus de greix consumit.

Els estudis *in vitro* recolzen les dades *in vivo* que indiquen menor viabilitat i major apoptosi per efecte de compostos minoritaris del OOVE, suggerint que els resultats observats *in vivo* podrien ser deguts tant a la composició en àcids grassos dels olis (per exemple modificant la composició lipídica dels tumors) com a l'efecte dels compostos minoritaris en el cas del OOVE. Els tumors mamaris del model experimental induïts per DMBA utilitzats en aquest treball presenten característiques semblants als del subtipus Luminal A del càncer de mama humà. Aquest subtipus es caracteritza per ser tumors hormonodependents (expressen receptors d'estrògens i progesterona), amb poca activitat proliferativa i amb baixa capacitat invasiva i metastàtica ^{67,282}. De les línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi, MCF-7 és la representativa del subtipus Luminal A i per tant la que presentaria característiques més similars als tumors experimentals. En aquest sentit, els resultats de metabolòmica *in vitro* estan en línia amb els observats *in vivo* i també suggereixen que els efectes del OOVE es donarien, en gran part, pels seus components minoritaris. L'hidroxitiosol (HT, un dels principals compostos minoritaris del OOVE), així com el flavonoide luteolina (LUT), han incrementat la captació i utilització de la glucosa, i han augmentat la OXPHOS, efectes que també es

Discussió global

van observar en els tumors *in vivo* per efecte del OOVE. En els tumors experimentals, l'estudi metabolòmic no va revelar diferències en els metabòlits intracel·lulars, però l'anàlisi de proteïnes va mostrar un influència del OOVE en l'expressió (gènica i/o proteica) dels enzims involucrats en el metabolisme de la glucosa així com en l'activitat d'enzims del cicle de Krebs. D'altra banda, els efectes dels polifenols quant al metabolisme de la glucosa van ser diferents en la línia cel·lular MDA-MB-231, amb diferents característiques moleculars i representativa d'un subtipus de càncer més agressiu, el que reforça que les conseqüències depenen del context molecular i la interrelació de diferents vies. En aquest sentit els resultats *in vitro* aporten noves evidències d'aquestes possibles interrelacions, ja que els tractaments amb els polifenols han modulats el metabolisme d'un carboni (cicle del folat i de la metionina) i GSH, que poden estar relacionats amb la mort cel·lular ²⁷⁸. Altrament, s'ha observat un increment de la secreció d'acetat i format que podria resultar un mecanisme d'eliminació de carbonis innecessaris en l'absència de proliferació degut a la superactivació metabòlica ^{174,250}. Aquests resultats per tant es poden relacionar amb una disminució de la proliferació i l'increment de la resposta antioxidant per efecte dels compostos minoritaris del OOVE, concordant amb les observacions en els tumors experimentals (un ambient més proapoptòtic per efecte de la dieta rica en OOVE, un increment de les vies proliferatives per efecte de la dieta rica en oli de blat de moro). De fet, diversos estudis en la literatura han descrit l'acció antioxidant i/o prooxidant dels polifenols i els seus efectes en la modulació del càncer a través de la modulació de ROS. De fet, alguns dels polifenols presents en la dieta s'han proposat com a teràpies coadjuvants als quimioterapèutics clàssics ja que, a través de la modulació del metabolisme i altres vies cel·lulars, sensibilitzen les cèl·lules als tractaments ²⁵⁷.

El fet que alguns dels efectes metabòlics observats en els estudis *in vitro* es puguin relacionar amb els canvis observats en els estudis *in vivo* és de rellevància i reforça la idea que l'OOVE és capaç de modificar les vies metabòliques i apoptòtiques en el càncer de mama. Aquests dos models experimentals (els tumors induïts *in vivo* amb DMBA i els models *in vitro*) presenten utilitats i limitacions, però es complementen a l'hora de permetre estudiar les condicions biològiques de la malaltia (model *in vivo*) i aproximar els mecanismes moleculars de base (models *in vitro*). Així, els tumors *in vivo* presenten característiques fisiopatològiques similars als tumors humans, però per

Discussió global

aquest motiu mostren elevada heterogeneïtat intra- i intertumoral, fet que dificulta la detecció de canvis que poden ser reals però subtils. A més, l'estudi es basa en un factor amb una influència feble, com és l'esperable en un factor nutricional, i amb efectes que poden ser diferents a curt termini o a llarg termini, a més de variables en funció del moment del cicle vital de l'animal. D'altra banda, l'estudi de dietes completes és més semblant a la situació que es dona en humans, i contempla totes les funcions fisiològiques de ingesta, digestió, absorció i transport, però aquests processos augmenten la variabilitat i es desconeix la biodisponibilitat dels components. A més, no permet discernir la contribució dels diferents elements de la dieta, que poden interaccionar de forma additiva, sinèrgica o antagònica. D'altra banda, les línies cel·lulars permeten aïllar l'efecte de diferents components, i dilucidar més fàcilment mecanismes moleculars, malgrat estar molt allunyats del procés fisiopatològic de la malaltia. En aquest sentit, els diferents components de l'OOVE que en els estudis *in vitro* han mostrat efectes comuns i diferencials, per exemple l'àcid oleic i l'HT en la proliferació, en una dieta es troben dins de la matriu de l'aliment i coexisteixen en l'individu exercint els seus efectes. En qualsevol cas, els estudis de metabolòmica en tumors permeten afirmar que la composició de la dieta es reflexa en la composició del tumor i que, malgrat no subministrar l'OOVE o els seus components directament sobre les cèl·lules tumorals, com en els dissenys *in vitro*, aquests components de la dieta arriben al tumor. D'altra banda, determinar la quantitat de cada polifenol en l'OOVE és difícil perquè depèn de l'origen de l'OOVE i/o dels processos d'obtenció de l'oli, entre d'altres. Tot i així, els estudis realitzats coincideixen en què l'HT és present en més quantitats i presenta una bioaccessibilitat més alta que la LUT²⁸³, fet que podria justificar que els efectes observats per part de la dieta rica en OOVE en els tumors mamaris experimentals concordi especialment amb els canvis metabòlics observats *in vitro* per part de l'HT.

En conclusió, el conjunt de resultats suggereix que l'OOVE pot tenir un efecte beneficiós en el risc de càncer de mama i en el progrés de la malaltia, a través de múltiples mecanismes com la modulació dels metabolisme tumoral i afavorint un ambient proapoptòtic en els tumors. Aquests efectes estarien mediat per diversos components de l'oli, com el perfil d'àcids grassos i especialment pels compostos minoritaris (presents en l'oli d'oliva verge), la qual cosa destaca la importància no

Discussió global

només del tipus d'oli consumit si no també de la seva qualitat, i des d'edats primerenques. La rellevància dels factors nutricionals és que són modificables, a diferència d'altres factors de risc. Per això es fa evident la importància de la millora d'estil de vida i hàbits dietètics, especialment en relació al consum de lípids, de la població general com a mesura de prevenció primària i secundària en la lluita contra el càncer de mama.



CONCLUSIONS

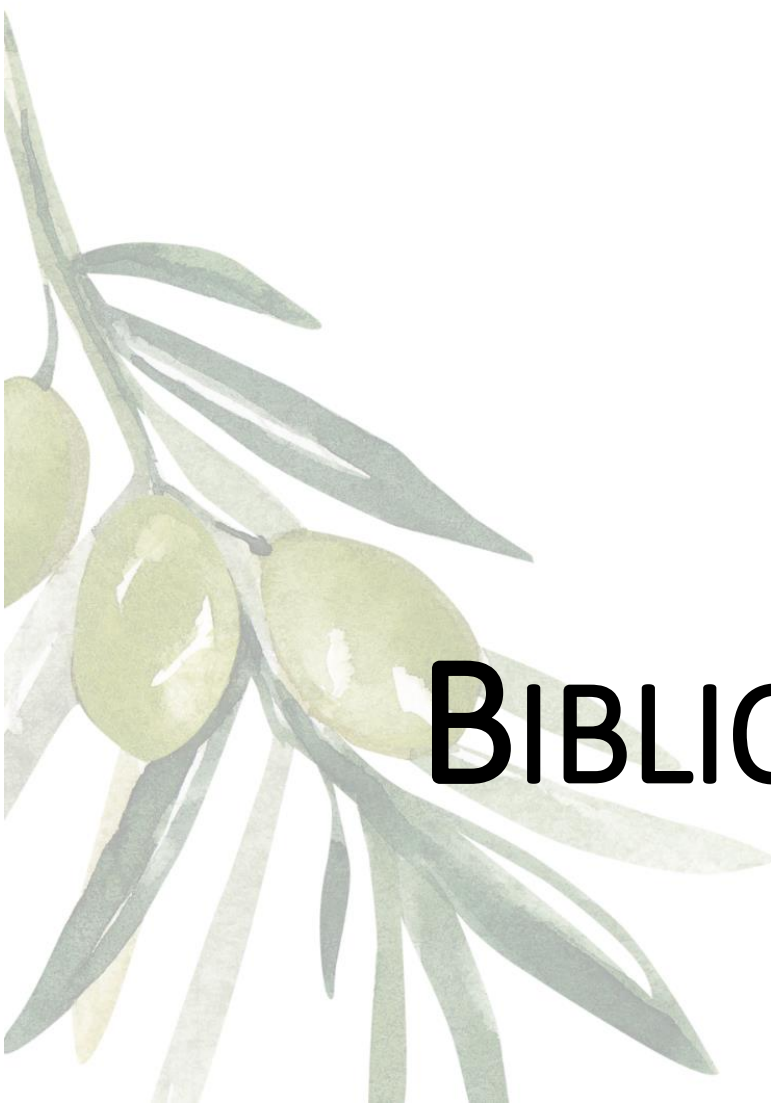
Conclusions

1. High-fat diets have **differential effects** on experimental mammary carcinogenesis, depending on the amount, type of fat, and timing of dietary intervention. A high corn oil diet (rich in **n-6 PUFA**) **promotes aggressive tumors**, while a high extra virgin olive oil (**EVOO**) diet has a **weak influence**, resulting in tumors similar to the low-fat control diet group.
2. The **EVOO-enriched** diet **increases** protein expression and activity of key enzymes in **glucose and mitochondrial metabolism** in experimental tumors. Contrary to previous findings, these metabolic changes are not linked to tumor malignancy, underscoring the significance of the **tumor context** and its interplay with other cell signaling pathways in understanding metabolic reprogramming.
3. The **n-6 PUFA-enriched diet** modifies tumor **lipid composition**, elevating PUFA and linoleic acid while reducing MUFA levels compared to the LF diet and EVOO-enriched diet. These findings align with alterations in the plasma membrane, potentially influencing cell signaling pathways.
4. The **EVOO-enriched diet enhances** the expression of proteins associated with different **apoptotic pathways** in **experimental tumors**, suggesting a pro-apoptotic environment that is consistent with the lower malignancy observed in these tumors.
5. The **effects** of the high EVOO diet on metabolism and apoptosis is influenced by the **timing of dietary intervention**, particularly when administered after induction. These findings may be linked to the differentiation status of the mammary gland during carcinogen exposure, rendering it sensitive to the influence of fat type consumed
6. The **EVOO minor compounds**, particularly hydroxytyrosol, **decrease cell viability** and **increase apoptosis** in two breast cancer **cell lines** (MCF-7 and MDA-MB-231), representing different molecular subtypes. In contrast, fatty acid treatments do not exhibit the same effect, implying that the potential benefits of EVOO are mainly attributed to its minor components.
7. **In vitro** treatments of BC cells with EVOO phenolic compounds, Hydroxytyrosol (HT) and Luteolin (LUT), revealed extensive **metabolic reprogramming**

Conclusions

depending on the cell type, which highlights the importance of the **metabolic and molecular context** in the effects of the treatments. In MDA-MB-231 cells both phenolic compounds decreased glycolysis and favored neutral lipid accumulations, whereas in MCF-7 cells they positively regulate glycolytic flux and neutral lipid breakdown.

8. HT and LUT treatments **increased mitochondrial metabolism, acetate production and formate secretion** in both cell lines, which can be **related to** metabolic adaptation to reduce biosynthetic needs, as observed by the **decreased viability**.
9. The set of metabolomic results suggests that **HT and LUT treatment** of BC cells would contribute to the **adaptation to oxidative stress** and would **sensitize** the cells to programmed **cell death**.



BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Biswas, S. K., Banerjee, S., Baker, G. W., Kuo, C. Y. & Chowdhury, I. The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *Int J Mol Sci* 23, 3883 (2022).
2. Hassiotou, F. & Geddes, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy* 26, 29–48 (2012).
3. Speroni, L., Schaeberle, C. M., Sonnenschein, C. & Soto, A. M. Mammary gland development. *Encyclopedia of Reproduction* 5, 786–792 (2018).
4. Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D. & Bissell, M. J. Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142, 1028–1042 (2015).
5. Elajnaf, T., Vandenberg, L. N. & Kennedy, S. H. Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nature reviews* 19, 46 – 61 (2023).
6. Fu, N. Y., Nolan, E., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development. *Physiol Rev* 100, 489–523 (2020).
7. Cardiff, R. D., Treuting, P. M. & Thompson, H. J. *Mammary Gland. Comparative Anatomy and Histology* 3, 485-508 (2018).
8. Líška, J. *et al.* Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland in female rat. *Exp Anim* 65, 1–9 (2016).
9. Russo, I. H. & Russo, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104, 938–967 (1996).
10. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249 (2021).
11. CÁNCER DE MAMA EN ESPAÑA. Sociedad Española de Oncología Médica. 2022.
12. Tavassoli, F. A. Breast Tumours WHO Classification of Tumours. *WHO Classification of Tumours* 2, 1 – 7 (2019).
13. Łukasiewicz, S. *et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review. *Cancers (Basel)* 1–30 (2021).
14. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 5, 1 – 31 (2019).

Bibliografia

15. Hilton, H. N., Clarke, C. L. & Graham, J. D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Mol Cell Endocrinol* 466, 2–14 (2018).
16. Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* 4, 127–129 (2017).
17. Shiovitz, S. & Korde, L. A. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Annals of Oncology* 26, 1291–1299 (2015).
18. Collins, A. & Politopoulos, I. The genetics of breast cancer: Risk factors for disease. *Application of Clinical Genetics* 4, 11–19 (2011).
19. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31–46 (2022).
20. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
21. Foulkes, W. D. Inherited Susceptibility to Common Cancers. *New England Journal of Medicine* 359, 2143–2153 (2008).
22. Crusio, W. E., Dong, H. & Radeke, H. H. *Translational research in breast cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology* (2021).
23. Hatano, Y., Tamada, M., Matsuo, M. & Hara, A. Molecular Trajectory of BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Front Oncol* 10, 1–10 (2020).
24. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12, 68–78 (2012).
25. Jia, L. *et al.* The Causal Effect of Reproductive Factors on Breast Cancer: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *J Clin Med* 12, 347 (2023).
26. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 11, 151–164 (2019).
27. Keen, J. C. & Davidson, N. E. The biology of breast carcinoma. *Cancer* 97, 825–833 (2003).
28. Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G. & Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol* 16, 4–20 (2017).
29. Fuentes, N. & Silveyra, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 116, 135–170 (2019).

Bibliografia

30. James D. Yager. Mechanisms of Estrogen Carcinogenesis: The Role of E2/E1-Quinone Metabolites Suggests New Approaches to Preventive Intervention – A Review. *Steroids* 99, 56–60 (2015).
31. Zubair, M., Wang, S. & Ali, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Front Pharmacol* 11, 1–24 (2021).
32. Zhou, Y. & Liu, X. The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomark Res* 8, 1–12 (2020).
33. Giuliano, M., Trivedi, M. V. & Schiff, R. Bidirectional crosstalk between the estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor 2 signaling pathways in breast cancer: Molecular basis and clinical implications. *Breast Care* 8, 256–262 (2013).
34. Trabert, B. *et al.* Association of Circulating Progesterone With Breast Cancer Risk Among Postmenopausal Women. *JAMA Netw Open* 3, e203645 (2020).
35. Clarke, R. B., Anderson, E. & Howell, A. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 316–323 (2004).
36. Bray, F. *et al.* *Edited by Cancer Incidence in Five Continents Vol. XI.* <http://www.iacr.com.fr/>. (2021).
37. Ubago-Guisado, E. *et al.* Evidence update on the relationship between diet and the most common cancers from the european prospective investigation into cancer and nutrition (Epic) study: A systematic review. *Nutrients* 13, 3582 (2021).
38. Anand, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25, 2097–2116 (2008).
39. Mohanty, S. S. & Mohanty, P. K. Obesity as potential breast cancer risk factor for postmenopausal women. *Genes Dis* 8, 117–123 (2021).
40. Bose, S., Allen, A. E. & Locasale, J. W. The Molecular Link from Diet to Cancer Cell Metabolism. *Mol Cell* 78, 1034–1044 (2020).
41. Lv, M., Zhu, X., Wang, H., Wang, F. & Guan, W. Roles of caloric restriction, ketogenic diet and intermittent fasting during initiation, progression and metastasis of cancer in animal models: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9, 1–17 (2014).
42. Sundaram, S. & Yan, L. High-fat diet enhances mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis and alters inflammatory and angiogenic profiles in MMTV-PyMT mice. *Anticancer Res* 36, 6279–6287 (2016).
43. Maddocks, O. D. K. *et al.* Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature* 544, 372–376 (2017).

Bibliografia

44. Abel, S., Riedel, S. & Gelderblom, W. C. A. Dietary PUFA and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society* 73, 361–367 (2014).
45. Cao, Y., Hou, L. & Wang, W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cancer* 138, 1894–1904 (2016).
46. Simonsen, N. R. *et al.* Tissue stores of individual monounsaturated fatty acids and breast cancer: The EURAMIC study. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 134–141 (1998).
47. Trichopoulou, A., Bamia, C., Lagiou, P. & Trichopoulos, D. Conformity to traditional Mediterranean diet and breast cancer risk in the Greek EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort. *American Journal of Clinical Nutrition* 92, 620–625 (2010).
48. Sealy, N., Hankinson, S. E. & Houghton, S. C. Olive oil and risk of breast cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *British Journal of Nutrition* 125, 1148–1156 (2021).
49. Gardeazabal, I. *et al.* Total polyphenol intake and breast cancer risk in the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *British Journal of Nutrition* 122, 542–551 (2019).
50. Guthrie, N. & Carroll, K. K. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog Lipid Res* 38, 261–271 (1999).
51. Schmitz, G. & Ecker, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47, 147–155 (2008).
52. Hillyer, L. M. *et al.* Her-2 Breast Cancer Outcomes Are Mitigated by Consuming n-3 Polyunsaturated, Saturated, and Monounsaturated Fatty Acids Compared to n-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Nutrients* 12, 3901 (2020).
53. Moral, R. & Escrich, E. Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. *Molecules* 27, 477 (2022).
54. Stark, A. H., Kossoy, G., Zusman, I., Yarden, G. & Madar, Z. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring. *Nutr Cancer* 46, 59–65 (2003).
55. Solanas, M. *et al.* 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* 21, 745–753 (2002).
56. Quiles, Jose L., Ramirez-Tortosa M.Carmen, Y. P. *Chemical composition, types and characteristics of olive oil.* *Olive Oil and Health* 10, 3984 (2006).

Bibliografia

57. Jimenez-Lopez, C. *et al.* Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods* 9, 1014 (2020).
58. Han, J., Talorete, T. P. N., Yamada, P. & Isoda, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59, 45–53 (2009).
59. Chimento, A., Casaburi, I., Rosano, C., Avena, P. & Luca, A. De. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER / GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 478–489 (2014).
60. Granados-principal, S., Quiles, J. L. & Ramirez-tortosa, C. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. *Mol Nutr Food Res* 5, 117–126 (2011).
61. Hassan, Z. K. *et al.* Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14, 6739–6742 (2013).
62. Elamin, M. H. *et al.* Synergistic Anti-Breast-Cancer Effects of Combined Treatment With Oleuropein and Doxorubicin In Vivo. *Alternative therapies* 5, 3455 (2019).
63. Wang, Y., Wang, J., Gong, X., Wen, X. & Gu, X. Review Article Luteolin: Anti-breast Cancer Effects and Mechanisms. *J Explor Res Pharmacol* 3, 85–90 (2018).
64. Lopez-Garcia, M. A., Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Marchió, C. & Reis-Filho, J. S. Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. *Histopathology* 57, 171–192 (2010).
65. Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T. & Lakhani, S. R. Molecular evolution of breast cancer. *Journal of Pathology* 205, 248–254 (2005).
66. Shin, S. J. *et al.* Molecular evidence for progression of microglandular adenosis (MGA) to invasive carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* 33, 496–504 (2009).
67. Costa, I., Solanas, M. & Escrich, E. Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced With 7, 12 Dimethylbenz(a) anthracene in the Rat. *Arch Pathol Lab Med* 126, 915–927 (2002).
68. Kerdelhué, B., Forest, C. & Coumoul, X. Dimethyl-Benz(a)anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. *Biochim Open* 3, 49–55 (2016).
69. Rundle, A. *et al.* The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis* 21, 1281–1289 (2000).

Bibliografia

70. Ma, Z. *et al.* DMBA promotes ErbB2-mediated carcinogenesis via ErbB2 and estrogen receptor pathway activation and genomic instability. *Oncol Rep* 40, 1632–1640 (2018).
71. Singhal, R., Shankar, K., Badger, T. M. & Ronis, M. J. Estrogenic status modulates aryl hydrocarbon receptor - Mediated hepatic gene expression and carcinogenicity. *Carcinogenesis* 29, 227–236 (2008).
72. Abunasef, S. K. & El-Beshbishy, R. A. The histological changes of the female rat mammary gland during the fertile period with a special reference to E-cadherin expression. *Egyptian Journal of Histology* 37, 45–55 (2014).
73. Lucas, J. N. *et al.* The rat mammary gland: Morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics. *Toxicol Pathol* 35, 199–207 (2007).
74. Zanoaga, O. *et al.* Implications of dietary ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids in breast cancer (Review). *Exp Ther Med* 15, 1167–1176 (2018).
75. Dall, G. V. & Britt, K. L. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. *Front Oncol* 7, 1–10 (2017).
76. Moral, R. *et al.* 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* 63, 410–420 (2011).
77. Xu, Y. *et al.* Dietary Fat and Polyunsaturated Fatty Acid Intakes during Childhood Are Prospectively Associated with Puberty Timing Independent of Dietary Protein. *Nutrients* 14, 275 (2022).
78. García-Estévez, L. *et al.* Obesity and Breast Cancer: A Paradoxical and Controversial Relationship Influenced by Menopausal Status. *Front Oncol* 11, 1–10 (2021).
79. Iyengar, N. M., Hudis, C. A. & Dannenberg, A. J. Obesity and Inflammation: New Insights into Breast Cancer Development and Progression. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 46–51 (2013).
80. Stern, J. H., Rutkowski, J. M. & Scherer, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab* 10, 273 (2016).
81. TenVooren, I. *et al.* Elevated leptin disrupts epithelial polarity and promotes premalignant alterations in the mammary gland. *Oncogene* 38, 3855–3870 (2019).
82. Zheng, Y. & Karnoub, A. E. Endocrine regulation of cancer stem cell compartments in breast tumors. *Mol Cell Endocrinol* 535, 111374 (2021).

Bibliografía

83. Reis, C. E. G., Bressan, J. & Alfenas, R. C. G. Effect of the diet components on adiponectin levels. *Nutr Hosp* 25, 881–888 (2010).
84. Gonzalez, H., Hagerling, C. & Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* 32, 1267–1284 (2018).
85. Hiam-Galvez, K. J., Allen, B. M. & Spitzer, M. H. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* 21, 345–359 (2021).
86. Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A. & Hulbert, A. J. Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1818, 1309–1317 (2012).
87. Finetti, F. *et al.* Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity Federica. *Biology (Basel)* 9, 1–26 (2020).
88. Aparicio-Soto, M., Sánchez-Hidalgo, M., Rosillo, M. Á., Castejón, M. L. & Alarcón-De-La-Lastra, C. Extra virgin olive oil: A key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food Funct* 7, 4492–4505 (2016).
89. Kossoy, G. 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* 8, 1045–1049 (2001).
90. Moreno, J. J. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med* 35, 1073–1081 (2003).
91. Miles, E. A., Zoubouli, P. & Calder, P. C. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21, 389–394 (2005).
92. Sunshine, H. & Iruela-Arispe, M. L. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin Lipidol* 28, 408–413 (2017).
93. Rysman, E. *et al.* De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* 70, 8117–8126 (2010).
94. Hilvo, M. *et al.* Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res* 71, 3236–3245 (2011).
95. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 281–296 (2018).

Bibliografia

96. Clamp, A. G., Ladha, S., Clark, D. C., Grimble, R. F. & Lund, E. K. The Influence of Dietary Lipids on the Composition and Membrane Fluidity of Rat Hepatocyte Plasma Membrane. *Lipids* 32, 179–184 (1997).
97. Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, L. H. & Else, P. L. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biological reviews* 5, 155–169 (2005).
98. Mukerjee, S., Saeedan, A. S., Ansari, M. N. & Singh, M. Polyunsaturated fatty acids mediated regulation of membrane biochemistry and tumor cell membrane integrity. *Membranes (Basel)* 11, 1–15 (2021).
99. Jump, D. B. Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, 41–78 (2004).
100. Mollinedo, F. & Gajate, C. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: Implications in tumor progression and therapy. *J Lipid Res* 61, 611–635 (2020).
101. Haggag, M. E. S. Y. E. S., Elsanhoty, R. M. & Ramadan, M. F. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 4, 52–58 (2014).
102. Bojková, B., Winklewski, P. J. & Wszedybyl-Winklewska, M. Dietary fat and cancer—which is good, which is bad, and the body of evidence. *Int J Mol Sci* 21, 1–56 (2020).
103. Eyster, K. M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: Lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education* 31, 5–16 (2007).
104. Kaput, J. & Rodriguez, R. L. Nutritional genomics: The next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 16, 166–177 (2004).
105. Khan, S. A. & Vanden Heuvel, J. P. Reviews: Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *Journal of Nutritional Biochemistry* 14, 554–567 (2003).
106. Reynés, B., Palou, M. & Palou, A. Gene expression modulation of lipid and central energetic metabolism related genes by high-fat diet intake in the main homeostatic tissues. *Food Funct* 8, 629–650 (2017).
107. Prendeville, H. & Lynch, L. Diet, lipids, and antitumor immunity. *Cell Mol Immunol* 19, 432–444 (2022).
108. Martinez-Chacin, R. C., Keniry, M. & Dearth, R. K. Analysis of high fat diet induced genes during mammary gland development: Identifying role players in poor prognosis of breast cancer. *BMC Res Notes* 7, 1–12 (2014).

Bibliografia

109. Moral, R. *et al.* Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. *Eur J Nutr* 55, 1397–1409 (2016).
110. Baylin, S. B. & Jones, P. A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, 1–35 (2016).
111. Lu, Y. *et al.* Epigenetic regulation in human cancer: The potential role of epidrugs in cancer therapy. *Mol Cancer* 19, 1–16 (2020).
112. Rodríguez-Miguel, C. *et al.* The role of dietary extra virgin olive oil and corn oil on the alteration of epigenetic patterns in the rat DMBA-induced breast cancer model. *PLoS One* 10, 1–16 (2015).
113. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 685–698 (2012).
114. Weinberg, F. & Chandel, N. S. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 3663–3673 (2009).
115. Qing, X. *et al.* Anticancer effect of (S)-crizotinib on osteosarcoma cells by targeting MTH1 and activating reactive oxygen species. *Anticancer Drugs* 29, 341–352 (2018).
116. Lee, J. D., Cai, Q., Shu, X. O. & Nechuta, S. J. The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *J Womens Health* 26, 467–482 (2017).
117. Tai, D. J. *et al.* Changes in intracellular redox status influence multidrug resistance in gastric adenocarcinoma cells. *Exp Ther Med* 4, 291–296 (2012).
118. Bowerman, B. Oxidative Stress and Cancer: A β -Catenin Convergence. 308, 1119–1120 (2005).
119. Renaudin, X. *Reactive oxygen species and DNA damage response in cancer. International Review of Cell and Molecular Biology* 364, 1937–6448 (2021).
120. Padmavathi, R., Senthilnathan, P. & 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. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 143, 349–354 (2006).
121. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1–40 (2006).
122. Oberley, L. W. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 59, 143–148 (2005).

Bibliografia

123. Magtanong, L. *et al.* Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. *Cell chem biol* 26, 420–432 (2019).
124. Suzuki, N. *et al.* Association between polyunsaturated fatty acid and reactive oxygen species production of neutrophils in the general population. *Nutrients* 12, 1–9 (2020).
125. Rossi, M. *et al.* Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet. *PLoS One* 12, 1–21 (2017).
126. Nakbi, A. *et al.* Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-D-exposed rats. *Lipids Health Dis* 9, 1–10 (2010).
127. Bartolomei, M. *et al.* Extra virgin olive oil phenolic extract on human hepatic HEPG2 and intestinal CACO-2 cells: Assessment of the antioxidant activity and intestinal trans-epithelial transport. *Antioxidants* 10, 1–20 (2021).
128. Domitrović, R., Tota, M. & Milin, Č. Oxidative stress in mice: Effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res* 113, 177–191 (2006).
129. Elmore, S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.* *Toxicol Pathol.* 35, 495 – 516 (2007).
130. Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W. & Kurokawa, M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 327, 43–87 (2016).
131. Lopez, J. & Tait, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 112, 957–962 (2015).
132. Shi, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science* 13, 1979–1987 (2004).
133. Jan, R. & Gul-e-Saba Chaudhry. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull* 9, 205–218 (2019).
134. Saelens, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874 (2004).
135. Singh, R., Letai, A. & Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 175–193 (2019).
136. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 30, 1–14 (2011).
137. Szegezdi, E., Fitzgerald, U. & Samali, A. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated apoptosis. The story so far. *Annals of the new york academy of science* 1010, 186–194 (2003).

Bibliografia

138. O'Brien, M. A. & Kirby, R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 18, 572–585 (2008).
139. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99 (2001).
140. Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K. & Fujii, T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ* 23, 952–961 (2016).
141. Mason, E. F. & Rathmell, J. C. Cell metabolism: An essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1813, 645–654 (2011).
142. Vaughn, A. E. & Deshmukh, M. Glucose Metabolism Inhibits Apoptosis in Neurons and Cancer Cells by Redox Inactivation of Cytochrome c. *Nat Cell Biol* 10, 1477–1483 (2008).
143. Iessi, E., Vona, R., Cittadini, C. & Matarrese, P. Targeting the Interplay between Cancer Metabolic Reprogramming and Cell Death Pathways as a Viable Therapeutic Path. *Biomedicines* 9, 4657 (2021).
144. Nganga, R., Oleinik, N. & Ogretmen, B. *Mechanisms of Ceramide-Dependent Cancer Cell Death. Advances in Cancer Research* 140, 149-161 (2018).
145. Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer* 18, 33–50 (2017).
146. Warburg, O. The metabolism of carcinoma cells 1. *J Cancer Res* 9, 148–163 (1925).
147. Heiden, M. G. vander, Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (1979) 324, 1029–33 (2009).
148. Rosenzweig, A., Blenis, J. & Gomes, A. P. Beyond the warburg effect: How do cancer cells regulate One-Carbon metabolism? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6, 3495 (2018).
149. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13, 472–482 (2008).
150. Kreuzaler, P., Panina, Y., Segal, J. & Yuneva, M. Adapt and conquer: Metabolic flexibility in cancer growth, invasion and evasion. *Mol Metab* 33, 83–101 (2020).
151. Dong, Y., Tu, R., Liu, H. & Qing, G. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct Target Ther* 5, 124 (2020).

Bibliografia

152. Gomes, A. S., Ramos, H., Soares, J. & Saraiva, L. P53 and Glucose Metabolism: an Orchestra To Be Directed in Cancer Therapy. *Pharmacol Res* 131, 75–86 (2018).
153. Fan, H. *et al.* Critical role of mTOR in regulating aerobic glycolysis in carcinogenesis (Review). *Int J Oncol* 58, 9–19 (2021).
154. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 5, 378–389 (2015).
155. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M. & Terentiev, A. A. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers (Basel)* 12, 1–31 (2020).
156. Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: Critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol* 41, 195–216 (2014).
157. Gupta, S., Roy, A. & Dwarakanath, B. S. Metabolic Cooperation and Competition in the Tumor Microenvironment: Implications for Therapy. *Front Oncol* 7, 1–24 (2017).
158. Whitaker-Menezes, D. *et al.* Evidence for a stromal-epithelial ‘lactate shuttle’ in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 10, 1772–1783 (2011).
159. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. & Lazebnik, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *Journal of Cell Biology* 178, 93–105 (2007).
160. Michalak, K. P., Mackowska-Kedziora, A., Sobolewski, B. & Wozniak, P. Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 964321 (2015).
161. Hensley, C. T., Wasti, A. T. & Deberardinis, R. J. Review series Glutamine and cancer: cell biology, physiology , and clinical opportunities. *J Clin Invest* 123, 3678–3684 (2013).
162. Lowman, X. H. *et al.* p53 Promotes Cancer Cell Adaptation to Glutamine Deprivation by Upregulating Slc7a3 to Increase Arginine Uptake. *Cell Rep* 26, 3051–3060 (2019).
163. C.Patra, K. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* 39, 347–354 (2014).
164. Kowalik, M. A., Columbano, A. & Perra, A. Emerging role of the pentose phosphate pathway in hepatocellular carcinoma. *Front Oncol* 7, 4734 (2017).

Bibliografia

165. Jin, L. & Zhou, Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett* 17, 4213–4221 (2019).
166. Jiang, P., Du, W. & Wu, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* 5, 592–602 (2014).
167. C.Stanton, R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life* 64, 362–369 (2012).
168. Ghanem, N. *et al.* The Pentose Phosphate Pathway in Cancer: Regulation and Therapeutic Opportunities. *Chemotherapy* 66, 179–191 (2021).
169. Cardaci, S. & Ciriolo, M. R. TCA cycle defects and cancer: When metabolism tunes redox state. *International Journal of Cell Biology* 5, 161837 (2012).
170. Eniafe, J. & Jiang, S. The functional roles of TCA cycle metabolites in cancer. *Oncogene* 40, 3351–3363 (2021).
171. Anderson, N. M., Mucka, P., Kern, J. G. & Feng, H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein and Cell* 9, 216–237 (2018).
172. Sajnani, K., Islam, F., Smith, R. A., Gopalan, V. & Lam, A. K. Y. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. *Biochimie* 135, 164–172 (2017).
173. Bose, S., Ramesh, V. & Locasale, J. W. Acetate Metabolism in Physiology, Cancer, and Beyond. *Trends in Cell Biology* 29, 695–703 (2019).
174. Schug, Z. T., Vande Voorde, J. & Gottlieb, E. The metabolic fate of acetate in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 708–717 (2016).
175. Schug, Z. T. *et al.* Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell* 27, 57–71 (2015).
176. Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism* 25, 27–42 (2017).
177. Pan, S., Fan, M., Liu, Z., Li, X. & Wang, H. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *International Journal of Oncology* 58, 158–170 (2021).
178. Yang, M. & Vousden, K. H. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 650–662 (2016).
179. Newman, A. C. & Maddocks, O. D. K. One-carbon metabolism in cancer. *British Journal of Cancer* 116, 1499–1504 (2017).

Bibliografija

180. Ananieva, E. A. & Wilkinson, A. C. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 21, 64–70 (2018).
181. Peng, H., Wang, Y. & Luo, W. Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Oncogene* 39, 6747–6756 (2020).
182. Mikalayeva, V., Pankevičiūtė, M., Žvikas, V., Skeberdis, V. A. & Bordel, S. Contribution of branched chain amino acids to energy production and mevalonate synthesis in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 585, 61–67 (2021).
183. Schiliro, C. & Firestein, B. L. Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells* 10, 394–406 (2021).
184. Santos, C. R. & Schulze, A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS Journal* vol. 279 2610–2623 (2012).
185. Koundouros, N. & Poulogiannis, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British Journal of Cancer* 122, 4–22 (2020).
186. Zaidi, N., Swinnen, J. v. & Smans, K. ATP-citrate lyase: A key player in cancer metabolism. *Cancer Research* vol. 72, 3709–3714 (2012).
187. Snaebjornsson, M. T., Janaki-Raman, S. & Schulze, A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism* 31, 62–76 (2020).
188. Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C. & Penn, L. Z. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 718–731 (2016).
189. Guerra, B. *et al.* The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 11, 150–162 (2021).
190. Wu, H., Southam, A. D., Hines, A. & Viant, M. R. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal Biochem* 372, 204–212 (2008).
191. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 46, D608–D617 (2018).
192. Kotepui, M. Diet and risk of breast cancer. *Wspolczesna Onkologia* 20, 13–19 (2016).
193. Escrich, E., Solanas, M. & Moral, R. *Olive oil and other dietary lipids in breast cancer. Cancer Treatment and Research* 159, 3847–3857 (2014).

Bibliografía

194. Gopinath, A. *et al.* The Impact of Dietary Fat on Breast Cancer Incidence and Survival: A Systematic Review. *Cureus* 14, 1–15 (2022).
195. MacLennan, M. & Ma, D. W. L. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Research* 12, 1–10 (2010).
196. Escrich, E. *et al.* Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II--Suitability of the diets. *In Vivo* 8, 1107–11 (1994).
197. Escrich, E., Solanas, M. & Segura, R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I--Diet definition. *In Vivo* 8, 1099–105 (1994).
198. Escrich, R. *et al.* A high-corn-oil diet strongly stimulates mammary carcinogenesis, while a high-extra-virgin-olive-oil diet has a weak effect, through changes in metabolism, immune system function and proliferation/apoptosis pathways. *Journal of Nutritional Biochemistry* 64, 218–227 (2019).
199. Cohen, L. A. Fat and endocrine-responsive cancer in animals. *Prev Med (Baltim)* 16, 468–474 (1987).
200. Ramírez-Expósito, M. J., Carrera, M. P., Cortés, P. & Martínez-Martos, J. M. Dietary Fat Including Olive Oil and Breast Cancer in the N-methyl Nitrosourea (NMU) Animal Model. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* 5, 969–979 (2010).
201. Manzanares, M. Á. *et al.* Ontogeny of the Major Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Expression and the Dietary Lipids Modulatory Effect in the Rat Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Breast Cancer Model. *J Biochem Mol Toxicol* 28, 539–548 (2014).
202. Manzanares, M. Á. *et al.* Dietary lipids differentially modulate the initiation of experimental breast carcinogenesis through their influence on hepatic xenobiotic metabolism and DNA damage in the mammary gland. *Journal of Nutritional Biochemistry* 43, 68–77 (2017).
203. Solanas, M. *et al.* Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis* 31, 871–879 (2009).
204. Tian, Q. *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Proteomics* 3, 960–969 (2004).
205. Pégurier, J. P., Le May, C. & Girard, J. Control of gene expression by fatty acids. *Journal of Nutrition* 134, 2444–2449 (2004).

Bibliografia

206. Haro, D., Marrero, P. F. & Relat, J. Nutritional regulation of gene expression: Carbohydrate-, fat- and amino acid-dependent modulation of transcriptional activity. *Int J Mol Sci* 20, 1444–1453 (2019).
207. Tang, Y., Lin, T. C., Kim, Y. C., Chung, S. & Liu, Z. High-Fat Diet Exposure in Early Life Alters Mammary Metabolic and Inflammatory Microenvironment in Favor of Breast Tumorigenesis Later in Life in Mice. *Current Oncology* 30, 4197–4207 (2023).
208. Cappelletti, V. *et al.* Metabolic Footprints and Molecular Subtypes in Breast Cancer. *Dis Markers* 2017, 871–879 (2017).
209. Arfin, S. *et al.* Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants* 67, 1–28 (2021).
210. Schoeniger, A., Wolf, P. & Edlich, F. How Do Hexokinases Inhibit Receptor-Mediated Apoptosis? *Antioxidants* 44, 871–879 (2022).
211. Yi, C. H., Vakifahmetoglu-Norberg, H. & Yuan, J. Integration of apoptosis and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76, 375–387 (2011).
212. Brand, M. D. & Esteves, T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2, 85–93 (2005).
213. Escrich, R., Vela, E., Solanas, M. & Moral, R. Effects of diets high in corn oil or in extra virgin olive oil on oxidative stress in an experimental model of breast cancer. *Mol Biol Rep* 47, 4923–4932 (2020).
214. Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. *et al.* Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS One* 11, e0153607 (2016).
215. Nakamura, H. & Takada, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci* 112, 3945–3952 (2021).
216. Reczek, C. R. & Chandel, N. S. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 1, 79–98 (2017).
217. Perillo, B. *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med* 52, 192–203 (2020).
218. Moco, S. Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. *Front Mol Biosci* 9, 1–12 (2022).
219. Markley, J. L. *et al.* The future of NMR-based metabolomics. *Current opinion biotechnology* 176, 139–148 (2017).
220. Turashvili, G. & Brogi, E. Tumor heterogeneity in breast cancer. *Front Med (Lausanne)* 4, 871–879 (2017).

Bibliografia

221. Borgan, E. *et al.* Merging transcriptomics and metabolomics - advances in breast cancer profiling. *BMC* 5, 587 – 597 (2010).
222. Sitter, B. *et al.* Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed* 30–40 (2006).
223. Li, M. *et al.* An HR-MAS MR Metabolomics Study on Breast Tissues Obtained with Core Needle Biopsy. *PLoS One* 6, 874–889 (2011).
224. McGee, E. E., Kiblawi, R., Playdon, M. C. & Eliassen, A. H. Nutritional Metabolomics in Cancer Epidemiology: Current Trends, Challenges, and Future Directions. *Curr Nutr Rep* 8, 187–201 (2019).
225. Gasco, M., Shami, S. & Crook, T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research* 8, 861–869 (2002).
226. Kossoy, G. *et al.* Transplacental effects of high fat diets on functional activity of the spleen and lymph nodes, cell kinetics and apoptosis in mammary gland tumors in female rat offspring. *Int J Mol Med* 10, 773–778 (2002).
227. Giros, A. *et al.* Regulation of colorectal cancer cell apoptosis by the n-3 polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic and eicosapentaenoic. *Cancer Prevention Research* 2, 732–742 (2009).
228. Liotti, A. *et al.* Oleic acid promotes prostate cancer malignant phenotype via the G protein-coupled receptor FFA1 / GPR40. *Cellular physiology* 7367–7378 (2018).
229. Xiang, F. *et al.* Omental adipocytes enhance the invasiveness of gastric cancer cells by oleic acid-induced activation of the PI3K-Akt signaling pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 84, 14–21 (2017).
230. Yang, P. *et al.* Dietary oleic acid-induced CD36 promotes cervical cancer cell growth and metastasis via up-regulation Src / ERK pathway. *Cancer Lett* 438, 76–85 (2018).
231. Storniolo, C. E., Mart, N., Mart, M., Lamuela-raventos, R. M. & Moreno, J. J. Extra Virgin Olive Oil Minor Compounds Modulate Mitogenic Action of Oleic Acid on Colon Cancer Cell Line. *J Agric Food Chem* (2019).
232. Li, S. *et al.* High Metastaticgastric and Breast Cancer Cells Consume Oleic Acid in an AMPK Dependent Manner. *PLoS One* 9, 871–879 (2014).
233. Bayat, S., Derakhshan, S. M., Derakhshan, N. M., Khaniani, M. S. & Alivand, M. R. Downregulation of HDAC2 and HDAC3 via oleuropein as a potent prevention and therapeutic agent in MCF - 7 breast cancer cells. *J Cell Biochem* 4, 9172–9180 (2019).

Bibliografia

234. Rosignoli, P., Sepporta, M. V. & Fabiani, R. Function In vitro chemo-preventive activities of hydroxytyrosol: the main phenolic compound present in extra-virgin olive oil. *Food Funct* 7, 301–307 (2016).
235. Cell, G. *et al.* Anti-proliferative Effects of Hydroxytyrosol Against Breast Cancer Cell Lines Through Induction of Apoptosis. *Gene Cell Tissue* 10, 1–7 (2023).
236. Sui, J. Q., Xie, K. P. & Xie, M. J. Inhibitory effect of luteolin on the proliferation of human breast cancer cell lines induced by epidermal growth factor. *Acta physiologica Sinica* 68, 27–34 (2016).
237. Kim, M. J. *et al.* Luteolin induces apoptotic cell death through AIF nuclear translocation mediated by activation of ERK and p38 in human breast cancer cell lines. *Cell Biol Int* 36, 339–344 (2012).
238. Lin, C. H. *et al.* Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway. *BMC Cancer* 15, 871–879 (2015).
239. Lee, E. J., Oh, S. Y. & Sung, M. K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 50, 4136–4143 (2012).
240. Calahorra, J., Martínez-Lara, E., De Dios, C. & Siles, E. Hypoxia modulates the antioxidant effect of hydroxytyrosol in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 13, 871–889 (2018).
241. Sirianni, R. *et al.* Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol Nutr Food Res* 54, 833–840 (2010).
242. Bayet-robot, M. & Morvan, D. Metabolomics Reveals Metabolic Targets and Biphasic Responses in Breast Cancer Cells Treated by Curcumin Alone and in Association with Docetaxel. *PLoS One* 8, 57971 (2013).
243. Uifalean, A. *et al.* The Impact of Soy Isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Using a Global Metabolomic Approach. *Int J Mol Sci* 6, 1–17 (2016).
244. Rushing, B. R., Wiggs, A., Molina, S., Schroder, M. & Sumner, S. Metabolomics Analysis Reveals Novel Targets of Chemosensitizing Polyphenols and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 24, 871–879 (2023).
245. Saunier, E. *et al.* Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Sci Rep* 54, 1–16 (2017).

Bibliografia

246. Blanquer-rosselló, M. M., Hernández-lópez, R., Roca, P., Oliver, J. & Valle, A. Biochimica et Biophysica Acta Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1861, 431–440 (2017).
247. Guerra, Â. R. *et al.* Metabolic Effects of a Eucalyptus Bark Lipophilic Extract on Triple Negative Breast Cancer and Nontumor Breast Epithelial Cells. *J Proteome Res* 20, 565–575 (2021).
248. Leo, M. *et al.* Transcriptomic Analysis of Colorectal Cancer Cells Treated with Oil Production Waste Products (OPWPs) Reveals Enrichment of Pathways of Mitochondrial Functionality. *Cells* 11, 1271–1283 (2022).
249. Liu, X. *et al.* Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals Article Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell* 175, 502–513 (2018).
250. Meiser, J. *et al.* Serine one-carbon catabolism with formate overflow. *Health and medicine* 2, 1–10 (2016).
251. Zhang, Y. *et al.* Cholesterol content in cell membrane maintains surface levels of ErbB2 and confers a therapeutic vulnerability in ErbB2-positive breast cancer. *Cell Communication and Signaling* 17, 1–12 (2019).
252. Ehmsen, S. *et al.* Increased Cholesterol Biosynthesis Is a Key Characteristic of Breast Cancer Stem Cells Influencing Patient Outcome. *Cell Rep* 27, 3927–3938.e6 (2019).
253. Maja, M. & Tyteca, D. Alteration of cholesterol distribution at the plasma membrane of cancer cells: From evidence to pathophysiological implication and promising therapy strategy. *Front Physiol* 13, 1–26 (2022).
254. Szlasa, W., Zendran, I., Zalesińska, A., Tarek, M. & Kulbacka, J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr* 52, 321–342 (2020).
255. Karonen, M. Insights into Polyphenol–Lipid Interactions: Chemical Methods, Molecular Aspects and Their Effects on Membrane Structures. *Plants* 11, 6871–6879 (2022).
256. Corsetto, P. A. *et al.* Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis* 10, 73 (2011).
257. Guerra, A. R., Duarte, M. F. & Duarte, I. F. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy. *J Agric Food Chem* 66, 10663–10685 (2018).

Bibliografia

258. Keating, E. & Martel, F. Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Frontiers in Nutrition* 5, 25 (2018).
259. Sun, Y. *et al.* Inhibitory effects of flavonoids on glucose transporter 1 (GLUT1): From library screening to biological evaluation to structure-activity relationship. *Toxicology* 488, 3677 (2023).
260. Chiaradonna, F., Ricciardiello, F. & Palorini, R. The nutrient-sensing hexosamine biosynthetic pathway as the hub of cancer metabolic rewiring. *Cells* 7, 236 – 247 (2018).
261. Jaroszewski, J., Kaplan, O. & Cohen, J. Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug- resistant MCF-7 human breast cancer cells: 31P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Res* 50, 170 (1990).
262. Azevedo, C. *et al.* The Chemopreventive Effect of the Dietary Compound Kaempferol on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line Is Dependent on Inhibition of Glucose Cellular Uptake The Chemopreventive Effect of the Dietary Compound Kaempferol on the MCF-7 Human Breast Cancer C. *Nutr Cancer* 145, 37–41 (2015).
263. Liemburg-Apers, D. C., Willems, P. H. G. M., Koopman, W. J. H. & Grefte, S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch Toxicol* 89, 1209–1226 (2015).
264. Lunetti, P. *et al.* Metabolic reprogramming in breast cancer results in distinct mitochondrial bioenergetics between luminal and basal subtypes. *FEBS J* 286, 688–709 (2019).
265. Zare, M. E. The rate of aerobic glycolysis is a pivotal regulator of tumor progression. *J Diabetes Metab Disord* 1, 523–531 (2021).
266. Dias, A. S., Almeida, C. R. & Helguero, L. A. Metabolic Reprogramming of Breast Tumor-Educated Macrophages Revealed by NMR Metabolomics. *Cancers (Basel)* 15, 1–21 (2023).
267. Wahdan-Alaswad, R. *et al.* Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell Cycle* 12, 3759–3769 (2013).
268. Robey, I. F., Lien, A. D., Welsh, S. J., Baggett, B. K. & Gillies, R. J. Hypoxia-inducible factor-1 α and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 7, 324–330 (2005).
269. Sakamoto, T., Niiya, D. & Seiki, M. Targeting the Warburg effect that arises in tumor cells expressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* 286, 14691–14704 (2011).

Bibliografia

270. Beatty, A. *et al.* Metabolite profiling reveals the glutathione biosynthetic pathway as a therapeutic target in triple negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapies* 17, 264–275 (2019).
271. Slika, H. *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 146, (2022).
272. Kang, K. A. *et al.* Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 51, 1169–1178 (2017).
273. Kouka, P. *et al.* Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of molecular medicine* 13, 703–712 (2017).
274. Jarc, E. & Petan, T. Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale journal of biology and medicine* 92, 435–452 (2019).
275. Ackerman, D. *et al.* Triglycerides Promote Lipid Homeostasis during Hypoxic Stress by Balancing Fatty Acid Saturation. *Cell Rep* 24, 2596-2605.e5 (2018).
276. Mileo, A. M. & Miccadei, S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 1 – 17 (2015).
277. Jung, K. H. *et al.* Resveratrol suppresses cancer cell glucose uptake by targeting reactive oxygen species-mediated hypoxia-inducible factor-1 α activation. *Journal of Nuclear Medicine* 54, 2161–2167 (2013).
278. De Berardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2, 1 – 18 (2016).
279. Ghanbari Movahed, Z., Rastegari-Pouyani, M., Mohammadi, M. hossein & Mansouri, K. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomedicine and Pharmacotherapy* 112, 108690 (2019).
280. Lacroix, M., Riscal, R., Arena, G., Linares, L. K. & Le Cam, L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol Metab* 33, 2–22 (2020).
281. Marvalim, C., Datta, A. & Lee, S. C. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy. *Theranostics* 13, 1421–1442 (2023).
282. Costa, E. *et al.* Experimental models as refined translational tools for breast cancer research. *Sci Pharm* 88, 1–29 (2020).

Bibliografia

283. Rocchetti, G. *et al.* Metabolomic Study to Evaluate the Transformations of Extra-Virgin Olive Oil's Antioxidant Phytochemicals During In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Antioxidants (Basel)* 9, 671–679 (2020).



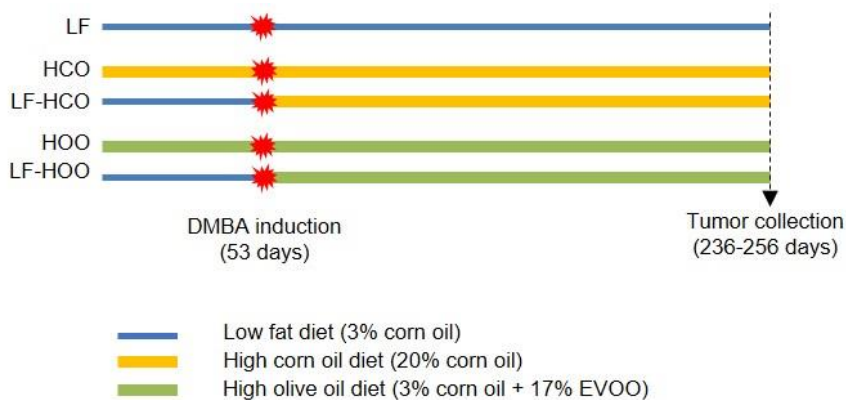
ANNEXOS

Annex 1

Disseny experimental

En el model experimental utilitzat, 100 rates femelles Sprague-Dawley (Charles River Lab.; soca CrI:OFA (SD), L'Arbresle Cedex, Francia) amb 23 dies d'edat es van separar en cinc grups (n=20 cada grup) depenent de la dieta administrada i del moment de la intervenció dietètica. Les rates van ser alimentades amb una dieta control, baixa en greixos (LF de l'anglès *low fat*), amb una dieta rica en oli de blat de moro o rica en OOVE. Les dietes hiperlipídiques van ser administrades en el moment del deslletament (HCO de l'anglès *high corn oil*, HOO de l'anglès *high olive oil*) o després de la inducció amb el carcinogen (LF-HCO, LF-HOO). La inducció dels tumors es va realitzar per instil·lació bucogàstrica amb 5 mg de 7,12-dimetilbenzantracè (DMBA) als 53 dies d'edat. Els animals van ser sacrificats als 236-256 dies i es van recollir les mostres tumorals per a l'estudi anatomopatològic i les anàlisis moleculars.

A partir del deslletament, tots els animals van ser pesats i inspeccionats setmanalment. Durant aquestes inspeccions, a partir del dia 74 d'edat (3 setmanes postinducció) es va determinar l'aparició, localització i els dos diàmetres majors dels tumors. Al final de l'assaig, el dia del sacrifici, es va determinar la fase del cicle estral, i per tal de respectar el ritme circadiari d'algunes hormones, l'eutanàsia es va dur a terme per decapitació entre les 10:00 i les 13:00 hores. Immediatament després es va realitzar la necròpsia i l'obtenció de mostres.



Disseny experimental. LF (low fat diet), HCO (high corn oil), HOO (high olive oil), EVOO (extra virgin olive oil).

Annex 2

Dietes

En aquest treball s'han utilitzat tres dietes semisintètiques, dissenyades i preparades en el laboratori, i la seva idoneïtat per a l'assaig va ser prèviament validada ^{55,196,197}. Breument, es va preparar una dieta control o LF (de l'anglès *low fat*) amb un 3% p/p d'oli de blat de moro, una dieta HCO (de l'anglès *high corn oil*) rica en oli de blat de moro (20% p/p d'aquest oli), i una dieta HOO (de l'anglès *high olive oil*) rica en OOVE (3% p/p d'oli de blat de moro i 17% p/p d'OOVE). La dieta LF contenia un 67,9% p/p d'hidrats de carboni en forma de dextrosa i un 18% p/p de proteïna en forma de caseïna. Les dietes hiperlipídiques contenien un 45,9% p/p d'hidrats de carboni i un 23% p/p de proteïna. Les tres dietes contenien un 5% p/p de cel·lulosa, 5,9% p/p de sal i un 0,24% de vitamines. Per tal d'assegurar un correcte funcionament del metabolisme lipídic, les dietes van ser suplementades amb metionina (0,51% p/p en la dieta LF i 0,66% en les hiperlipídiques), colina (1800 mg/kg per dieta) i àcid fòlic (5 mg/kg per dieta). Les dietes van ser preparades setmanalment, i emmagatzemades a 4°C en atmosfera de nitrogen i a la foscor.

Composició de la dieta (g/kg)	LF	HCO	HOO
Hidrats de carboni (dextrosa)	679	459	459
Proteïnes (caseïna)	180	230	230
Lipids			
Oli de blat de moro	30	200	30
Oli d'oliva verge extra	0	0	170
Àcids grassos saturats	4,3	28,8	32,2
Àcids grassos monoinsaturats (MUFA)	9,6	64,2	138
Àcids grassos poliinsaturats n-6 (PUFA n-6)	15,4	102,6	27,8
Àcids grassos poliinsaturats n-3 (PUFA n-3)	0,15	1	1,5
Isomers totals d'àcid grassos trans	0,5	3,4	0,5
Fibra (cel·lulosa)	50	50	50
Mix de vitamines¹	59	59	59
Mix de minerals¹	2,4	2,4	2,4

Annexos

Components minoritaris dels olis (mg/kg)

Alcohols triterpènics	117,9	786,2	1679,2
Fitoesterols	232,7	1551,6	511,4
Hidrocarburs			
Esqualè	14,6	97	991,2
Esteroids	28,2	188	28,2
Carotenoids	0,04	0,2	1,2
Fenols lipofílics (tocoferols, tocotrienols)	53,8	358,4	98,6
Fenols hidrofílics			
Alcohols fenòlics (hidroxitirosol, tirosol)	0	0	4,9
Secoiridoids (oleuropeïna, ligstroside)	0	0	18,5
Lignans	0	0	1,9
Flavonoides	0	0	2,4
Energia			
Densitat energètica (kcal/g)	3,706	4,556	4,556
% energia de les proteïnes	19,43	20,19	20,19
% energia dels carbohidrats	73,29	40,3	40,3
% energia dels lípids	7,29	39,51	39,51

¹ La composició de les mix de vitamines i minerals es detallen en ¹⁹⁷.

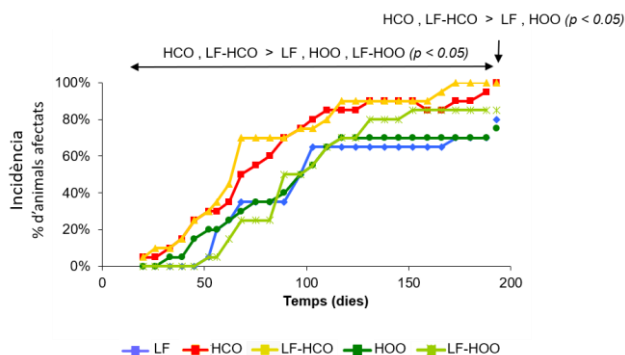
Annex 3

Resultats previs sobre els paràmetres de la carcinogènesi de model experimental.

Amb les dades obtingudes en l'assaig experimental es van analitzar els paràmetres de la carcinogènesi en els diferents grups. L'anàlisi de cadascun dels paràmetres va constar de dues parts: l'estudi temporal, a partir de les dades obtingudes en la monitorització setmanal dels animals, i l'estudi puntual, amb les dades obtingudes al final de l'assaig (el dia de l'eutanàsia). L'estudi puntual no es va poder realitzar amb el volum total, ja que, es tracta d'una única dada per grup. La comparació entre corbes de l'estudi temporal es va fer mitjançant l'anàlisi de la variància no paramètrica de 2 factors (Test de Friedman), mentre que les dades en el moment final (sacrifici) es van analitzar amb la prova xi-quadrat (χ^2).

Incidència

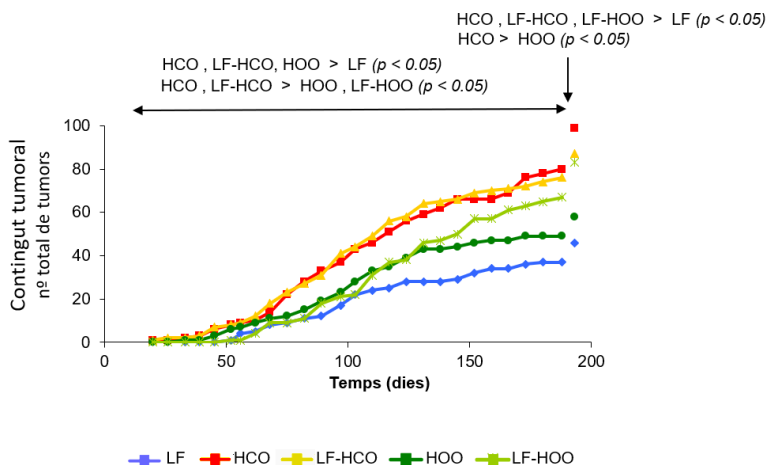
La incidència d'afectació es defineix com el coeficient entre el número d'animals que presenten un o més tumors respecte al total d'animal del grup. El percentatge d'animals afectats va ser significativament superior en els grups que van rebre una dieta rica en oli de blat de moro (HCO i LF-HCO) respecte al grup control i als grups que van rebre una dieta rica en OOVE (HOO i LF-HOO). En el moment del sacrifici, els grups de la dieta rica en oli de blat de moro van presentar percentatges d'incidència significativament superiors al control i al grup HOO.



Annexos

Contingut tumoral

El contingut tumoral total és el numero total de tumors per grup experimental. Durant tot l'estudi els grups que van rebre la dieta rica en oli de blat de moro van presentar un número total de tumors més elevat que la resta de grups experimentals. Pel que fa als grups que van rebre la dieta rica en OOVE, el contingut tumoral total va presentar valors intermedis, més propers als del grup control.



Volum tumoral

El volum tumoral es va calcular a partir dels dos diàmetres més grans de cada tumor, valors determinants durant la monitorització dels animals de l'assaig. Respecte al volum final, aquest es va calcular a partir dels tres diàmetres del tumor mesurats després del sacrifici i la necròpsia. Els resultats d'aquest paràmetre van mostrar una evolució clarament diferent per part del grup HCO respecte a la resta de grups, que van resultar més semblants entre ells.

