



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA INCIACIÓN
DEL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL: ONTOGENIA DE LAS
ENZIMAS DE DETOXIFICACIÓN DE XENOBIÓTICOS,
METABOLISMO DEL CARCINÓGENO Y DAÑO EN EL ADN.**

Memoria presentado por MIGUEL ÁNGEL MANZANARES SERRANO para optar al grado de Doctor en Biología.

Bellaterra, noviembre 2014.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA INCIACIÓN
DEL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL: ONTOGENIA DE LAS
ENZIMAS DE DETOXIFICACIÓN DE XENOBIÓTICOS,
METABOLISMO DEL CARCINÓGENO Y DAÑO EN EL ADN.**

Memoria presentado por MIGUEL ÁNGEL MANZANARES SERRANO para optar al grado de Doctor en Biología.

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

Miguel Á. Manzanares Serrano

Montserrat Solanas García

Eduard Escrich Escriche

Bellaterra, noviembre 2014.

Este trabajo ha sido cofinanciado en parte mediante ayudas del Plan Nacional I+D+I [2004-2007] AGL2006/ALI y [2008-2011] AGL2011-24778, Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008-2012 (FPCO2008-165.396; FPCO2013-611.084), Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino (AAO2008-165.471) y Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español 2009-2013 (OIP2009-165.646) y “Departament de Salut i d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya” (GC2010-165.000). Los patrocinadores no han intervenido en el diseño del estudio, la obtención de datos, o el análisis e interpretación de los resultados de este trabajo.

*A todos los que me han apoyado
estos cuatro años, en especial a
Juan y Mariona.*

*Todo pasa y todo queda,
pero lo nuestro es pasar,
pasar haciendo caminos,
caminos sobre el mar.*

*Nunca perseguí la gloria,
ni dejar en la memoria
de los hombres mi canción;
yo amo los mundos sutiles,
ingrávidos y gentiles,
como pompas de jabón.*

*Me gusta verlos pintarse
de sol y grana, volar
bajo el cielo azul, temblar
súbitamente y quebrarse...*

Nunca perseguí la gloria.

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante no hay camino
sino estelas en la mar...*

...

Antonio Machado

El último día, a la última hora, llega el momento de terminar cuatro años de duro trabajo con el merecido agradecimiento a todas las personas que nos han acompañado en este camino.

Al Dr. Eduard Escrich Escriche, Profesor del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona, Director del Grupo Multidisciplinario para el Estudio del Cáncer de Mama, gracias por la dirección de este trabajo, por el tiempo dedicado, por su comprensión y apoyo, y por su capacidad de motivación; por haber sido un ejemplo de incansable dedicación profesional y perseverancia personal.

A la Dra. Montserrat Solanas García, Profesora del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona, y Co-Directora de este trabajo, muchas gracias por el contacto y el seguimiento diario, por enseñarme la importancia de la rigurosidad y el aprecio por los pequeños detalles para alcanzar la perfección, porque tu apoyo ha sido imprescindible para la finalización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorios, de despachos y de vida laboral mezclada con la personal, a Raquel Moral, Raquel Escrich, Elena, Montse, Meritxell, Cris y Cristina. También a los que ya no están pero de los que nos seguimos acordando, en especial a Isabel y Marta, sin olvidarnos de Nadia, Pedro y Laura, porque de todo este tiempo me llevo muy buenos momentos con cada uno de vosotros.

A los alumnos internos Paula Poveda, Melcior Carbonell, Francesca Rapino, Laura Déu y Vanesa Coronado por su participación en la serie experimental 1 de este trabajo.

A la Dra. Irmgard Costa, del Servicio de Anatomía Patológica de la Corporación Parc Taulí (Hospital General de Sabadell, Barcelona) por su inestimable colaboración en el diagnóstico histopatológico de los muestras.

A la Dra. María del Carmen Ruiz de Villa, Profesora del Departamento de Bioestadística de la Universidad de Barcelona, por su dedicación e imprescindible colaboración en el tratamiento estadístico de estos resultados.

A los profesores y compañeros de la Unidad de Fisiología Médica por su ayuda siempre que fue necesaria.

A la Dra. Regina M. Santella, Vice Decana de Investigación y Claustro de la Universidad de Columbia, Profesora de Ciencias de Salud Ambiental, Directora del Centro de Salud Ambiental del Norte de Manhattan, Co-Directora del Programa de Epidemiología en Cáncer y Directora del Centro de Recursos de Biomarcadores Compartidos, del “Herbert Irving Comprehensive Cancer Center” de la Universidad de Columbia, Nueva York, gracias por la calurosa acogida en su laboratorio y por permitirme aprender sus técnicas y utilizar sus recursos. Gracias también a sus colaboradores por su amabilidad e inestimable colaboración.

A Álvaro González-Coloma, Carlos Sánchez, Fernando López-Segura, Teresa Pérez e Isabel Bombal, gracias por su interés en el trabajo realizado por el grupo de investigación.

Al personal del Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona por su colaboración y amabilidad.

A los miembros del P.A.S. de la Facultad de Medicina y a los Vigilantes por realizar un trabajo imprescindible para que podamos hacer nosotros el nuestro.

Gracias a mis padres y hermanos, por estar siempre ahí a pesar de la distancia, por ser los pilares que me han permitido construir mi propio camino, por darme las oportunidades que no tuvieron a pesar de saber que me llevarían lejos de ellos. En especial a mi madre, Celeste, por no juzgarme nunca, por ser ejemplo de generosidad y entrega, por su fuerza y sus ganas de luchar que me han enseñado a no rendirme nunca. Y a mis hermanos, por empujarme a ser el ejemplo que ellos esperan que sea.

A Barcelona, por haber sido mi casa durante estos años, por haberme permitido conocer a las personas que ahora cuento como amigas. A todos ellos, les doy las gracias por el apoyo recibido, por la comprensión y los ánimos. Por los buenos momentos, por las risas y las fiestas pero sobre todo por haber estado conmigo también en los malos momentos. No daré todos los nombres, porque tardaría otras dos horas en terminar estos agradecimientos, pero ellos, compañeros de clase, de casas, de trabajos, de experiencias erasmus, familias postizas,... ya saben quiénes son. A todos, muchísimas gracias!

Si agradezco a Barcelona, no puedo olvidarme de Murcia, porque allí siguen mis grandes amigos de siempre, de toda la vida y para toda la que quede, porque nos hemos criado o al menos hemos ido creciendo juntos, porque nos entendemos y porque aunque nos vemos poco con vosotros el tiempo no pasa.

A Thiago, por haberme apoyado en este último periodo del doctorado, por haber sido paciente y comprensivo, por haberme ayudado siempre en todo lo que ha estado en su mano, por hacerme reír y por esperarme.

Finalmente, una mención especial a la Gran Duquesa, por ser ese personaje que te saca una risa en el peor de los momentos.

<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	1
<u>ÍNDICE DE TABLAS</u>	5
<u>ABREVIATURAS</u>	7
<u>RESUMEN</u>	13
<u>ABSTRACT</u>	15
<u>INTRODUCCIÓN</u>	17
A. <u>DESARROLLO ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA</u>	19
1. HUMANA	19
2. RATA	21
B. <u>CÁNCER DE MAMA</u>	24
1. FACTORES ENDOCRINOS	25
2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS	28
3. FACTORES AMBIENTALES	32
C. <u>LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA</u>	35
1. CRECIMIENTO, MADURACIÓN SEXUAL Y OBESIDAD	38
2. INFLUENCIA SOBRE EL ESTATUS HORMONAL	40
3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR	42
4. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	44
5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA	46
6. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	49
7. ESTRÉS OXIDATIVO	51
D. <u>MODELO EXPERIMENTAL</u>	53
E. <u>METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS. INICIACIÓN DE LA CARCINOGENÉISIS</u> <u>MAMARIA E INFLUENCIA DE LA DIETA</u>	56
1. XENOBIÓTICOS. DESCRIPCIÓN E INFLUENCIA SOBRE LA SALUD	56
1.1. EFECTOS EN LA CARCINOGENÉISIS	58
2. METABOLISMO DE XENOBIOTICOS. FASE I Y FASE II	60
2.1. ENZIMAS IMPLICADAS	62
2.2. REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS	65
2.3. INFLUENCIA DE FACTORES DIETÉTICOS	76
3. METABOLISMO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs). EL CASO DEL 7,12-DIMETILBENZA(α)ANTRECENO (DMBA)	80
3.1. ENZIMAS IMPLICADAS. CARACTERÍSTICAS Y EXPRESIÓN TEJIDO- ESPECÍFICA	81

3.2. FORMACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS E INTERACCIÓN CON EL ADN (ADUCTOS DMBA-ADN)	87
3.3. REPARACIÓN DE LOS ADUCTOS DMBA-ADN	93
E. <u>OBJETIVOS</u>	97
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	101
A. <u>ENSAYOS BIOLÓGICOS</u>	103
1. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES	103
2. DIETAS EXPERIMENTALES	103
3. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS	108
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	109
4.1. SERIE EXPERIMENTAL 1	109
4.2. SERIE EXPERIMENTAL 2	110
5. EXPLORACIONES PERIODICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA	112
B. <u>ANÁLISIS MORFOLÓGICOS</u>	115
1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES	115
2. INMUNODETECCIÓN DE LOS ADUCTOS DMBA-ADN EN LA GLÁNDULA MAMARIA	115
C. <u>TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR</u>	117
1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL	118
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (Real Time PCR)	119
3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES	121
3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y MICROSOMALES	121
3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	123
4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA. WESTERN-BLOT	124
5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	126
5.1. ACTIVIDAD EROD	126
5.2. ACTIVIDAD NQO1	129
5.3. ACTIVIDAD GST	132
6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN. INMUNOPRECIPITACIÓN	134
7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE METABOLITOS DEL DMBA EN PLASMA. CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)	136
D. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	139
1. ENSAYOS BIOLÓGICOS	139
1.1 CARCINOGENESIS	139

2. HISTOLOGÍA, MORFOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	140
3. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	141
<u>RESULTADOS</u>	143
A. <u>ONTOGENIA DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS (XMEs) EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA EN LA RATA SPRAGUE-DAWLEY</u>	145
1. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA	145
2. EFECTOS DE LA EDAD SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN HÍGADO	148
3. EFECTOS DE LA EDAD SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN GLÁNDULA MAMARIA	153
B. <u>MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA</u>	155
1. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN HÍGADO	155
2. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN GLÁNDULA MAMARIA	160
C. <u>INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL DMBA</u>	162
1. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LAS XMEs DE FASE I EN HÍGADO	162
2. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LAS XMEs DE FASE II EN HÍGADO	170
3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE LAS XMEs POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA	176
4. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE METABOLITOS DEL DMBA	181
5. DAÑO EN EL ADN: FORMACIÓN DE ADUCTOS DMBA-ADN EN LA GLÁNDULA MAMARIA	184
D. <u>PARAMETROS DE LA CARCINOGENESIS</u>	188
1. SERIE EXPERIMENTAL 1	188
1.1 PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	188
1.2. TIEMPO DE LATENCIA	189
1.3. INCIDENCIA	191
1.4. CONTENIDO TUMORAL	192
1.5. VOLUMEN TUMORAL	195
2. SERIE EXPERIMENTAL 2	199

ÍNDICE

2.1 PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS	
CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	199
2.2. TIEMPO DE LATENCIA	200
2.3. INCIDENCIA	202
2.4. CONTENIDO TUMORAL	203
2.5. VOLUMEN TUMORAL	204
E. <u>EVOLUCIÓN PONDERAL Y MASA CORPORAL</u>	207
<u>DISCUSIÓN</u>	215
A. <u>ONTOGENIA DE LAS PRINCIPALES XMEs EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA EN LA RATA SPRAGUE-DAWLEY</u>	217
B. <u>MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA</u>	225
C. <u>INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO DEL DMBA Y SUS CONSECUENCIAS EN EL TEJIDO DIANA</u>	238
D. <u>PARAMETROS DE LA CARCINOGENÉISIS</u>	250
E. <u>EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL</u>	255
F. <u>BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS</u>	257
<u>CONCLUSIONES</u>	265
<u>CONCLUSIONS</u>	271
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	275
<u>ANEXO</u>	307

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara.....	21
Figura 2: Estructuras epiteliales de la glándula mamaria	22
Figura 3: Topografía de la glándula mamaria de rata	23
Figura 4: Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres	25
Figura 5: Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz(α)antraceno (DMBA)	54
Figura 6: Nomenclatura y clasificación de los principales CYPs en humanos	63
Figura 7: Mecanismos generales de la inducción de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs)	65
Figura 8: Vías de señalización canónicas (A) y no canónicas (B,C y D) de AhR	68
Figura 9: Interacción Keap1-Nrf2	71
Figura 10: Activación de Nrf2 a través del efecto de AhR	73
Figura 11: Algunos miembros representativos de la familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	81
Figura 12: Tipos de regiones <i>bay</i> y <i>fiord</i> que se pueden encontrar en los diferentes PAHs	90
Figura 13: Principales vías de metabolización de los PAHs. Ejemplo del B(a)P	93
Figura 14: Principales sistemas de reparación de los aductos producidos por el DMBA	95
Figura 15: Diseño experimental de la serie 1	109
Figura 16: Diseño experimental de la serie 2	111
Figura 17: Exploraciones periódicas de los animales	114
Figura 18: Reacción general del ensayo de actividad EROD	126
Figura 19: Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad EROD	127
Figura 20: Reacción general del ensayo de actividad NQO1	129
Figura 21: Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad NQO1	130
Figura 22: Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad GST	133
Figura 23: Cromatograma de los patrones de DMBA y sus metabolitos	139
Figura 24: Imagen representativa de un cromatograma modelo de las muestras de plasma	139
Figura 25: Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase I en hígado	149
Figura 26: Efecto de la edad sobre la expresión hepática de las XMEs de fase I a través de la modulación de AhR	150
Figura 27: Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en hígado	151
Figura 28: Efecto de la edad sobre la expresión hepática de las XMEs de fase II a través de la modulación de Nrf2	152
Figura 29: Balance del efecto de la edad sobre la expresión de las XMEs de fase I y fase II.....	152
Figura 30: Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm de las XMEs de fase I en glándula mamaria	153

Figura 31: Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en glándula mamaria	154
Figura 32: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase I en hígado	156
Figura 33: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión hepática de las XMEs de fase I a través de la modulación de AhR	157
Figura 34: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en hígado	15
Figura 35: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión hepática de las XMEs de fase II a través de la modulación de Nrf2.....	158
Figura 36: Balance del efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de las XMEs de fase I y fase II	159
Figura 37: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de las XMEs de fase I en glándula mamaria	160
Figura 38: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en glándula mamaria	161
Figura 39: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 en hígado de animales inducidos con DMBA	163
Figura 40: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 en hígado de animales sanos	166
Figura 41: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad EROD en hígado de animales inducidos con DMBA	167
Figura 42: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad EROD en hígado de animales sanos	169
Figura 43: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de NQO1 y GSTP1 en hígado de animales inducidos con DMBA	171
Figura 44: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de NQO1 y GSTP1 en el hígado de los animales sanos	172
Figura 45: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad NQO1 y GST en hígado de animales inducidos con DMBA	174
Figura 46: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad NQO1 y GST en hígado de animales sanos	175
Figura 47: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la retención citoplasmática de AhR y Nrf2 en hígado de animales inducidos con DMBA	177
Figura 48: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de AhR en el hígado de los animales inducidos con DMBA (izquierda) y de los animales sanos (derecha)	178
Figura 49: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de Nrf2 en hígado de animales inducidos con DMBA (izquierda) y de animales sanos (derecha)	180

Figura 50: Determinación de los niveles de DMBA y de sus principales metabolitos en plasma de animales inducidos.....	182
Figura 51: Picos cromatográficos que presentan los iones m/z 344 y m/z 329	183
Figura 52: Efecto de los lípidos de la dieta sobre la formación de aductos DMBA-ADN en glándula mamaria de animales inducidos	185
Figura 53: Detección de aductos DMBA-ADN en glándula mamaria 24 horas después de la administración del carcinógeno en los diferentes grupos experimentales. Imagen representativa de inmunohistoquímica	186
Figura 54: Detección de aductos DMBA-ADN en glándula mamaria 48 horas después de la administración del carcinógeno en los diferentes grupos experimentales. Imagen representativa de inmunohistoquímica	187
Figura 55: Imágenes histopatológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales	189
Figura 56: Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	192
Figura 57: Contenido tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	193
Figura 58: Contenido tumoral medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	194
Figura 59: Volumen tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	196
Figura 60: Volumen tumoral medio por animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	197
Figura 61: Volumen medio por tumor de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	198
Figura 62: Imágenes histopatológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales	200
Figura 63: Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	202
Figura 64: Contenido tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	203
Figura 65: Contenido tumoral medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	204
Figura 66: Volumen tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	205
Figura 67: Volumen tumoral medio por animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	206
Figura 68: Volumen medio por tumor de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	206

Figura 69: Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales de los diferentes grupos de la serie experimental 1	208
Figura 70: Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales de los diferentes grupos de la serie experimental 2	210
Figura 71: Índices de masa corporal de los diferentes grupos experimentales en la serie experimental 1	211
Figura 72: Evolución del Índice de Lee de los diferentes grupos en la serie experimental 2	212
Figura 73: Evolución del Índice de Masa Corporal de los diferentes grupos en la serie experimental 2.....	213
Figura 74: Metabolismo hepático del DMBA responsable de daño genómico en la glándula mamaria durante la iniciación de la carcinogénesis.	263

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Compuestos fitoquímicos activadores de AhR y/o Nrf2	78
Tabla 2:	Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta)	105
Tabla 3:	Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados en la serie experimental 1	106
Tabla 4:	Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados en la serie experimental 2	106
Tabla 5:	Otros compuestos analizados de los aceites utilizados en la serie experimental 1	107
Tabla 6:	Ensayos TaqMan® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante Real Time-PCR	121
Tabla 7:	Anticuerpos utilizados y condiciones de los ensayos Western Blot	125
Tabla 8:	Patrón de expresión de las XMEs de fase I y fase II en hígado y glándula mamaria	147
Tabla 9:	Análisis estadístico de la expresión de ARNm de las XMEs en hígado y en glándula mamaria	148
Tabla 10:	Análisis estadístico de la expresión de ARNm de las XMEs entre tejidos	148
Tabla 11:	Comparación de la expresión de ARNm de las XMEs y de los factores de transcripción AhR y Nrf2 entre animales inducidos y sanos	164
Tabla 12:	Comparación de la actividad enzimática de las XMEs entre animales inducidos y sanos	168
Tabla 13:	Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio en la serie experimental 1	188
Tabla 14:	Tiempo de aparición del primer tumor en los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	189
Tabla 15:	Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	190
Tabla 16:	Análisis estadístico del tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	190
Tabla 17:	Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	191
Tabla 18:	Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1	191
Tabla 19:	Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio en la serie experimental 2	199
Tabla 20:	Tiempo de aparición del primer tumor en los distintos grupos experimentales. Serie experimental 2	200

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 21: Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	201
Tabla 22: Análisis estadístico del tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	201
Tabla 23: Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	201
Tabla 24: Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2	202

ABREVIATURAS

$_1C_i$	Grupo control inducido de la serie experimental 1
$_1M_i$	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1
$_1O_i$	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra inducido de la serie experimental 1
$_2C_i$	Grupo control de dieta normolipídica inducido de la serie experimental 2
$_2C_s$	Grupo control de dieta normolipídica sano de la serie experimental 2
$_2M_i$	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2
$_2M_s$	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz sano de la serie experimental 2
$_2O_i$	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra inducido de la serie experimental 2
$_2O_s$	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra sano de la serie experimental 2

Dieta m3	dieta experimental normolipídica
Dieta M20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de maíz
Dieta mO20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra

AA	<i>Aromatic amines</i>
AB	<i>Alveolar buds</i>
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Ade	Adenina
ADN	Ácido dexosirribonucleico
AhR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
AKRs	<i>Aldo-keto reductases</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ARE'	<i>AU-rich element</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>

b	<i>Basic-region</i>
B(a)A	Benzo(a)antraceno
B(a)P	Benzo(a)pireno
<i>bHLH/PAS</i>	<i>Basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
bZIP	<i>Basic-region leucine zipper</i>

CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CLA	Ácido linoleico conjugado
CNC	<i>Cap'n'collar</i>
COX	Ciclooxigenasa
CPR	<i>NADPH-dependent cytochrome P450 reductase</i>
CYP	<i>Cytochrome P450</i>

DAG	Diacilglicerol
dAdo	Desoxi-adenosina
dCyd	Desox-citosina
d.e.	Días de edad
dGuo	Desoxi-guanosina
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DR	<i>Direct repeat elements</i>
DRE	<i>Dioxin response elements</i>
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DSBs	<i>Double strand break</i>

E2	17 β -estradiol
----	-----------------------

ABREVIATURAS

ECCs	<i>Exogenous chemicals compounds</i>
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EH	<i>Epoxyde hydrolase</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EpRE	<i>Electrophile response element</i>
ER	<i>Everted repeat</i>
EROD	<i>Ethoxyresorufin-O-deethylase activity</i>
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FFA	<i>Free fatty acids</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
G6PD	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GSTs	Glutación S-transferasas
Gua	Guanina
HAAs	<i>Heterocyclic aromatic amines</i>
hHR23B	<i>Human homologue of the yeast protein RAD23 B</i>
HLH	<i>Helix-loop-helix</i>
HPAHs	<i>High molecular weight PAHs</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
IDH1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IP	<i>Ionization potencial</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated proteína 1</i>
Kj	Contenido Tumoral Medio
Lob	Lobulillos
LPAHs	<i>Low molecular weight PAHs</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDRs	Multidrug resistant proteins
miRNA	microARN
MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
MMR	<i>Mismatch repair system</i>
MRPs	<i>Multidrug resistance-associated proteins,</i>
MSH	<i>DNA mismatch repair protein</i>
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NADH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido</i>
NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato</i>
NATs	<i>N-acetyltransferases</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair system</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Naturall killer</i>
NOCs	<i>N-nitroso compounds</i>
NQO1	<i>NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-Like 2</i>

OATPs	<i>Organic anion-transporting polypeptides</i>
OEA	Oleiletanolamida
ORF	<i>Open reading frame</i>
8-oxo-dG	7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxyguanosine
PA	Ácido fosfatídico
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PAS	<i>Per-Arnt-Sim</i>
PCBs	<i>Polychlorinated biphenyls</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen A</i>
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGD	<i>Phosphogluconate dehydrogenase</i>
PHAHs	<i>Polyhalogenated aromatic hydrocarbons</i>
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMS2	<i>Mismatch repair endonuclease 2</i>
POLδ	<i>DNA polymerase δ</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
Rb	Retinoblastoma
RE	Receptor de estrógenos
RFC	<i>Replication factor C</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
ROIs	<i>Reactive oxygenated intermediate</i>
ROS	<i>Reactive oxygen speceis</i>
RP	Receptor de progesterona
RPA	<i>Replication Protein A</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SD	Sprague-Dawley
SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulators
Sim	<i>Single-minded</i>
sMaf	<i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
SOD	Superóxido dismutasa
STs	Sulfotransferasas
TA	<i>Transactivation</i>
TCDD	<i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i>
TDs	<i>Terminal ducts</i>
TDLU	<i>Terminal ductal lobular unit</i>
TEBs	<i>Terminal end buds</i>
TFIIH	<i>Transcription factor II Huma</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tj	Contenido tumoral total
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRx	Tiorredoxina
TTDA	<i>Trichothiodystrophy A</i>
Ub	Ubicuitina
UDP	<i>Uridine diphosphate</i>
UGTs	UDP-Glucuronosiltransferasas
UTR	<i>Untranslated regions</i>

ABREVIATURAS

V	Volumen tumoral total por grupo
V _A	Volumen tumoral medio por animal
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
V _K	Volumen medio por tumor
XAP2	<i>X-associated protein 2</i>
XMEs	<i>Xenobiotic metabolizing enzymes</i>
XP	<i>Xeroderma Pigmentosum</i>
XRE	<i>Xenobiotic response element</i>
ZIP	<i>Leucine zipper domain</i>



RESUMEN

ABSTRACT

RESUMEN

El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres de todo el mundo. Además de los factores genéticos, epigenéticos y hormonales, existen evidencias epidemiológicas y experimentales de que los factores nutricionales y ambientales tienen un papel en la etiología y el desarrollo de esta enfermedad. Los lípidos de la dieta se han relacionado directamente con el cáncer, fundamentalmente, el de mama. El grupo de investigación ha contribuido al mejor conocimiento de los efectos y de los mecanismos de acción de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz, rico en ácidos grasos poliinsaturados, PUFA n-6, y el aceite de oliva virgen extra, rico en ácidos grasos monoinsaturados, MUFA n-9, y diversos compuestos bioactivos, en el cáncer de mama experimental, obteniendo un efecto estimulador y potencialmente protector, respectivamente. Estas dietas actuaron fundamentalmente sobre la etapa de la promoción de la carcinogénesis. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si estos lípidos podían intervenir, además, sobre la iniciación mediante la modulación de la metabolización y/o detoxificación de los agentes iniciadores carcinogénicos, tanto a nivel hepático como de la propia glándula mamaria. Los resultados proceden de dos series experimentales diferentes, desarrolladas en el modelo experimental de cáncer de mama inducido en la rata con el hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). En ambas se estudiaron las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs) de la fase I: CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, y de la fase II: GSTP1 y NQO1. En la primera serie se evaluó el efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión en hígado y glándula mamaria de las XMEs en edades clave del desarrollo (prepuberal, puberal y postpuberal/adulta). En la segunda, se estudiaron específicamente las horas inmediatamente posteriores a la administración del carcinógeno y se analizó el efecto de los lípidos de la dieta sobre el metabolismo hepático, la generación de compuestos reactivos y el daño genómico provocado en la glándula mamaria. Los resultados han mostrado que los lípidos de la dieta son capaces de modular la expresión de las XMEs en distintas etapas del desarrollo postnatal. Además, la dieta rica en PUFA n-6 incrementó la expresión de las enzimas de fase I, en edades previas a la administración del DMBA, y aumentó la actividad de los CYP1s en las horas inmediatamente posteriores (12 y 24 horas post inducción), al mismo tiempo que disminuyó la actividad enzimática de la fase II, principalmente de NQO1. El número de metabolitos reactivos generados en hígado y el daño genómico en la glándula en los animales alimentados con la dieta rica en aceite de maíz fue mayor que en los otros dos grupos. Por otro lado, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra y la dieta control normolipídica presentaron una actividad de fase I y II mejor coordinada, presentando una menor producción de metabolitos reactivos y menor daño en el ADN en la glándula mamaria. La concordancia de estos resultados con los parámetros de la carcinogénesis en ambas series demostró el efecto de los lípidos sobre la iniciación de la carcinogénesis mamaria experimental, además de la ya descrita modulación durante las fases de promoción/progresión. Los resultados de este trabajo, junto con otros previos sobre los efectos de los lípidos durante la maduración sexual y la diferenciación de la glándula mamaria, sugieren que estos nutrientes, en función de la cantidad y del tipo, pueden modificar diferencialmente la susceptibilidad o resistencia de la glándula mamaria al desarrollo del cáncer y, por tanto, modular las ventanas de susceptibilidad frente a la exposición a carcinógenos ambientales.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy among women all over the World. Besides the genetic, epigenetic and hormonal factors, there are epidemiologic and experimental evidences that nutritional and environmental factors have a role in the etiology and the development of this cancer. The dietary lipids are directly related with cancer, mainly breast cancer. The research group has contributed to the best understanding of the effects and the mechanisms of action of the high corn oil, rich in polyunsaturated fatty acid (PUFA) n-6, and the high extra virgin olive oil diets, rich in monounsaturated fatty acids (MUFA) n-9 and several bioactive compounds, in the experimental breast cancer, resulting in a stimulating and a potentially protective effect, respectively. These diets mostly acted on the carcinogenesis promotion stage. The aim of this work has been to research on the intervention of these lipids, furthermore, over the initiation through the modulation of the bioactivation and/or detoxification of the carcinogenic initiator agents, both in hepatic level and the mammary gland itself. Results proceed from two different experimental series, developed in the experimental breast cancer model induced in the rat with the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). In both series the xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs) were studied, CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 from the phase I, and GSTP1 and NQO1 from the phase II. The first series analyzed the effect of the dietary lipids on the XMEs expression in the liver and the mammary gland in critical development ages (prepubertal, pubertal and postpubertal/adult). The second series studied specifically the hours immediately after the carcinogen administration and analyzed the effect of the dietary lipids on its hepatic metabolism, the generation of reactive compounds and the genomic damage in the mammary gland. Results showed that dietary lipids may modulate the XMEs expression in different stages of the postnatal development. Additionally, the diet rich in PUFA n-6 increased the expression of phase I enzymes, in ages previous to DMBA administration, and raised CYP1s activity in the hours immediately after induction (12 and 24 hours), while reducing the enzyme activity of phase II, mainly NQO1. The number of reactive metabolites generated in the liver and the genomic damage in the mammary gland of the animals fed the high corn oil diet was higher than in the other groups. On the other hand, the high extra virgin olive oil diet and the normolipidic control diet exhibit a better coordinated phase I and phase II activity, showing a lower production of reactive metabolites and smaller DNA damage in the mammary gland. Concordance between these results and the carcinogenesis parameters in both series showed the effect of lipids on the initiation of the experimental mammary carcinogenesis, besides the already described modulation during promotion/progression stages. Results of this work, along with previous others on the effects of lipids during sexual maturity and mammary gland differentiation suggest that these nutrients, depending on the amount and type, can differently modify the mammary gland susceptibility or resistance to cancer development, and therefore, modulate the windows of susceptibility over the exposure to environmental carcinogens.



INTRODUCCIÓN

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

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

1. HUMANA

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

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

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

aumento del número de células en cada ciclo ovulatorio ([2631], [2633], [2638], [3123], [3332]).

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

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

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

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

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

2. RATA

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

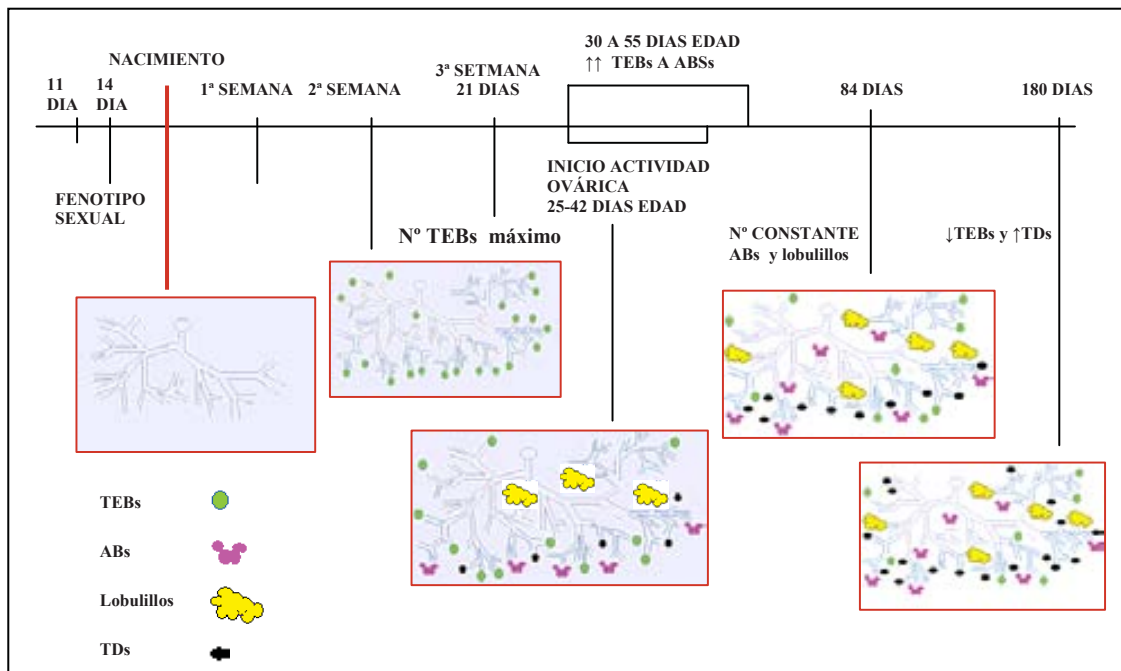


Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara.

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

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

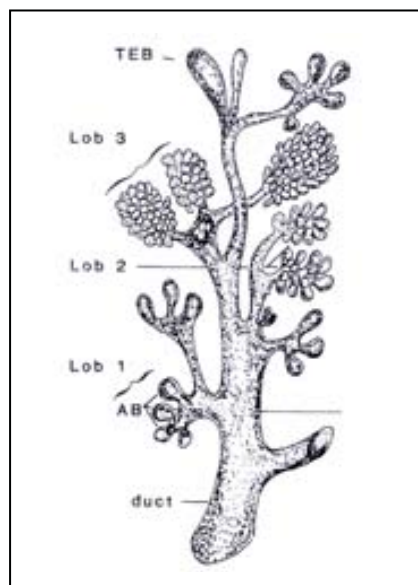


Figura 2. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria. Imagen de Russo&Russo [7671].

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

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

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

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

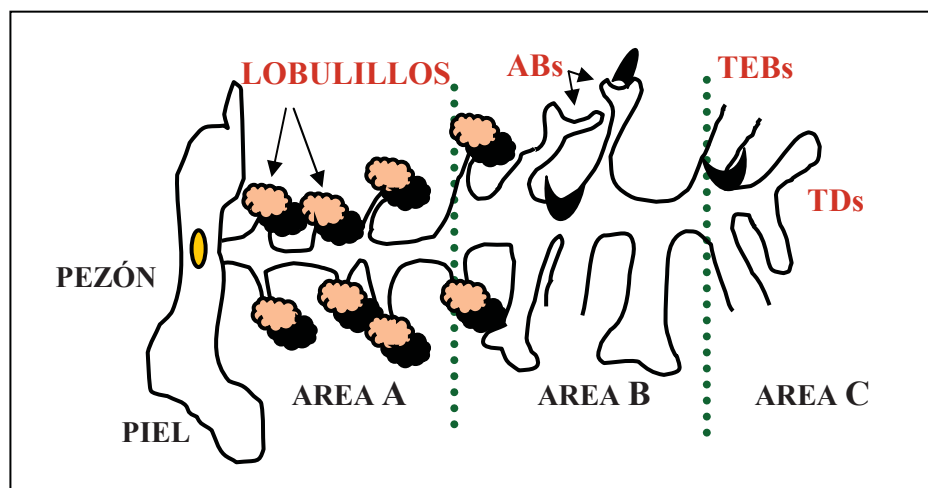


Figura 3. Topografía de la glándula mamaria de rata.

Una vez terminada la lactancia, la glándula mamaria padece una involución pero aún así, su arquitectura restará permanentemente modificada, de manera que presentará un gran número de ABs y lobulillos. Se ha descrito que a los 40-42 días post-destete las glándulas de

una rata multípara, en comparación con las de una rata nulípara, no tienen TEBs y ocasionalmente TDs. El número de ABs es similar, mientras que el de lobulillos es aproximadamente 4 veces mayor que el de una rata virgen adulta.

B. CÁNCER DE MAMA.

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

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

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

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

El cáncer de mama es un proceso neoplásico de etiología multifactorial y que se desarrolla en múltiples etapas (“multistep”). Diversos factores, actuando de forma simultánea y/o secuencial, regulan las distintas etapas de la carcinogénesis mamaria. La naturaleza de estos factores es variada y pueden clasificarse en: endocrinos, genéticos y ambientales.

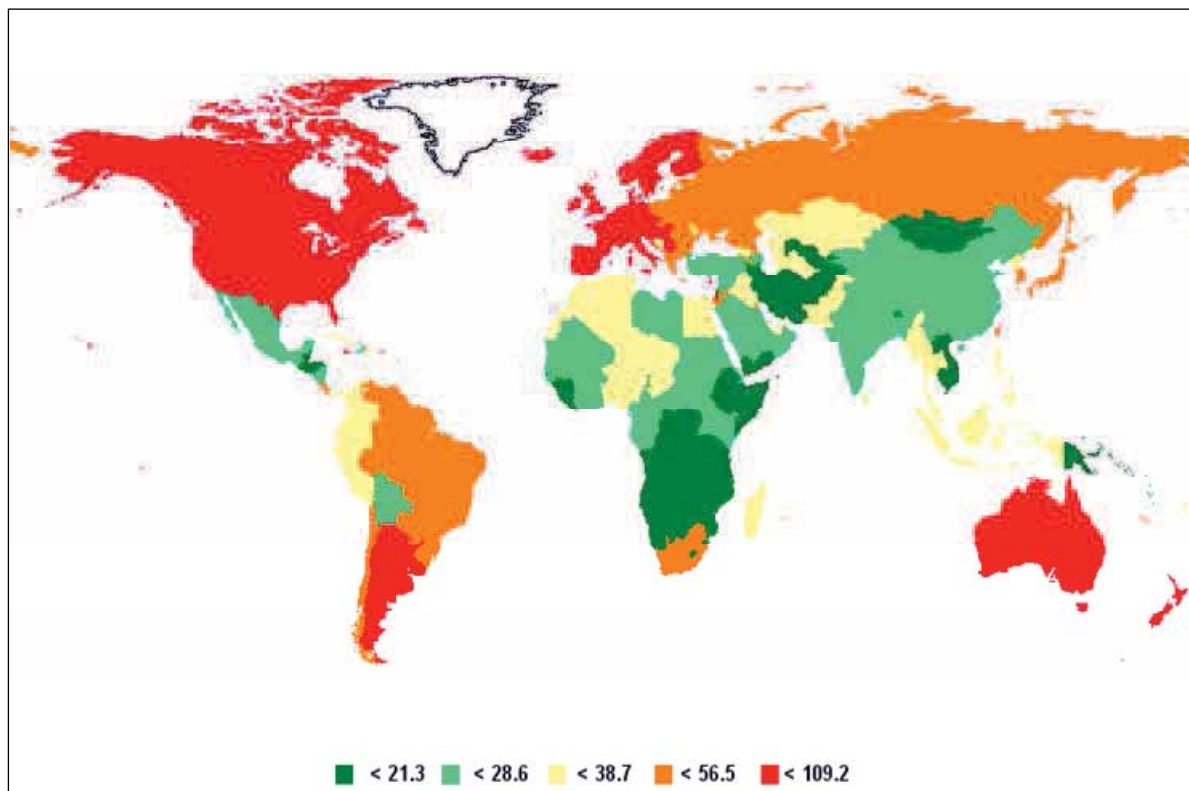


Figura 4. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres. Globocan, 2008 ([7108]).

1. FACTORES ENDOCRINOS.

La etiología y progresión del cáncer de mama tienen un fuerte componente hormonal. Así, los estrógenos, fundamentalmente estradiol y estrona, y los andrógenos, a

concentraciones fisiológicas, estimulan la proliferación de las células tumorales mamarias. Las dosis farmacológicas de progesterona, la insulina y la prolactina, también ejercen un efecto estimulador. En cambio, los estrógenos y los andrógenos a dosis farmacológicas y las dosis fisiológicas de progesterona son inhibidores. Las maniobras terapéuticas ablativas como la ovariectomía, la hipofisectomía y la adrenalectomía, provocan la regresión tumoral. El embarazo ejerce un efecto protector si precede a la transformación de la glándula mamaria y un efecto estimulador si es posterior. El efecto protector del embarazo, así como el de la gonadotropina coriónica humana, está relacionado con la diferenciación de la glándula, asociada con la depresión de la proliferación celular y la síntesis de inhibina por las células epiteliales mamarias ([2406], [3370]). Por otro lado, en mujeres postmenopáusicas, la fuente de estrógenos es el tejido adiposo. En éste, un sistema enzimático de aromatasas P450 convierte los andrógenos, secretados por la glándula adrenal, en estrógenos. Por lo tanto, mujeres con un incremento en la grasa corporal presentarían niveles incrementados de estrógenos y un mayor riesgo de padecer cáncer de mama ([4595]).

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

La determinación de los receptores esteroideos ha permitido clasificar los tumores mamarios, según su contenido receptor, en hormonodependientes (RE+ RP+) y hormonoindependientes (RE- RP-). También existen otros tumores que presentan interpretaciones

controvertidas (RE+ RP- y RE- RP+). La mayoría de los tumores mamarios experimentales presentan ambos tipos de receptores y su contenido medio es mayor cuanto menor es la dosis de carcinógeno utilizada ([798], [1678]). En cáncer de mama humano, esta clasificación ha resultado de gran utilidad puesto que permite seleccionar a las pacientes candidatas de terapia hormonal. Además, el contenido en receptores, junto con otros factores pronóstico, ayuda a distinguir las pacientes con mayor riesgo de recurrencia. Al menos un 70% de las pacientes con cáncer de mama son clasificadas como RE+, por lo que el tratamiento más aplicado es el de interferir en la actividad estrogénica ([7062]). Sin embargo, la determinación de los receptores no es suficiente para discernir la hormonodependencia funcional, como lo demuestra el hecho que entre un 20 y un 30% de los tumores con receptores no responden a la terapia endocrina (tumores hormonoinsensibles). Se han propuesto diferentes causas para esta resistencia al tratamiento antiestrogénico, como la pérdida de la funcionalidad de RE o mutaciones del mismo, alteraciones post-receptor, o producción alterada de factores autocrinos o paracrinos, entre otras ([3405]). La estructura, el patrón de expresión y las funciones de los receptores de estrógenos y progesterona se discutirán con más detalle en el subapartado E.2.

Finalmente, al analizar el papel de los factores endocrinos en el cáncer de mama, debe considerarse el de las hormonas exógenas, y en particular el de los estrógenos. Existe una gran variedad de fuentes externas de estrógenos, también conocidos como xenoestrógenos, los cuales son la clase más numerosa dentro de los disruptores endocrinos ([7681]). Son sustancias químicas, exógenas al organismo, que presentan una actividad hormonal esteroideal (estrogénica) y cuando se ingieren o se absorben tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino. Pueden distinguirse: fitoestrógenos y micoestrógenos, como las isoflavonas, lignanos y coumestanos; compuestos químicos sintéticos, entre los que se encuentran esteroides sintéticos y SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) como el tamoxifeno; y contaminantes medioambientales hormonalmente activos, como compuestos clorados (pesticidas, bifeniles policlorados y dioxinas/furanos), alkifenólicos (detergentes, antioxidantes en plásticos, espermicidas, cosméticos y champús) y bisfenol-A y/o derivados (policarbonatos, empastes dentales, resinas acrílicas y fungicidas) ([4653], [4662], [4713], [7678], [7679], [7681]). En general, la estimación del riesgo de padecer cáncer de mama por la exposición a hormonas exógenas es difícil, ya que el período de latencia entre la exposición y la aparición de los síntomas de la enfermedad es largo. La genisteína, un fitoestrógeno presente en la soja, muestra un efecto quimiopreventivo en modelos experimentales con tumores mamarios inducidos químicamente. En humanos, se ha observado una asociación

entre el aumento del consumo de soja y la disminución del riesgo de padecer cáncer de mama ([4506]). Los SERMs con actividad antiestrogénica constituyen la principal terapia endocrina utilizada actualmente. Dentro de este grupo, el tamoxifeno es un antagonista no esterooidal que actúa por inhibición competitiva con el estradiol en su unión a órganos diana, pero a muy altas concentraciones posee un efecto estimulador del cáncer de mama ([2363], [3326]). El tamoxifeno reduce la mortalidad y recurrencia del cáncer de mama en el 25 y 50% de los casos, respectivamente, en mujeres receptor de estrógenos positivo (RE+), aunque una tercera parte de éstas no responden a dicho tratamiento ([4505]).

2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS.

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

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

predisposición a padecer diferentes tipos de neoplasia se hereda como un típico carácter mendeliano autosómico ([2493]).

Las alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de éstos y, probablemente, otros genes implicados en procesos tan esenciales para la célula como la proliferación, la diferenciación o la apoptosis se hallan en la base de los mecanismos moleculares del cáncer. Hanahan y Weinberg en el año 2000 describieron una serie de capacidades esenciales que compartían las células tumorales, y en una revisión posterior añadieron características nuevas de la célula tumoral ([3973], [7349]). En total se han descrito 8 capacidades esenciales: 1) autosuficiencia en cuanto a la necesidad de factores de crecimiento; 2) insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento; 3) evasión de la muerte programada (apoptosis); 4) potencial ilimitado de replicación; 5) evasión del sistema inmune; 6) reprogramación del metabolismo energético tumoral; 7) angiogénesis sostenida; 8) invasión de tejidos y metástasis. Además, se ha atribuido dos capacidades facilitadoras de la supervivencia de las células tumorales, como son la inestabilidad genómica y mutación, y la promoción de la inflamación tumoral. La adquisición de todas estas capacidades implica alteraciones de los genes anteriormente mencionados.

La primera de las características mencionadas hace referencia al hecho de que la célula tumoral, en comparación con la célula normal, muestra una reducida dependencia de las señales exógenas estimuladoras del crecimiento. Esta capacidad incluye varios mecanismos, entre los que se encuentran la adquisición de la habilidad de sintetizar factores de crecimiento (como PDGF y TGF α (*Transforming growth factor* α)); la alteración de la expresión y/o activación de receptores de factores de crecimiento, como EGFR y ErbB2; la alteración de algunos de los componentes de las vías de señalización intracelular mitogénica, como la vía Sos-Ras-Raf-ERK1/2 -en el 30% de los tumores humanos las proteínas Ras se encuentran estructuralmente alteradas, lo que genera un flujo de señales mitogénicas hacia la célula sin necesidad de estimulación de sus reguladores “upstream”-; o la inducción de la síntesis de factores de crecimiento por las células vecinas ([1576], [1881], [5484]). Otra de las particularidades de la célula tumoral es la capacidad de evadirse de las señales antiproliferativas que en un tejido normal mantienen las células quiescentes y la homeostasis tisular. Algunas de estas señales están asociadas con componentes responsables del paso de las células por la fase G1 del ciclo celular, como la proteína Rb (pRb) fosforilada, p107 y p130; y con la diferenciación, como el factor de transcripción c-myc, APC/ β -Catenina, etc

([3973]). Pero el cáncer no aparece necesariamente como resultado de un aumento de la tasa de proliferación celular, sino que su desarrollo depende del balance crítico entre este proceso y el de apoptosis. Por tanto, la desregulación de la proliferación junto con la reducción de la apoptosis serían los fenómenos responsables de crear un “escenario” que sería necesario y a la vez suficiente para el desarrollo del cáncer ([4061], [5576]).

La adquisición de las capacidades de autonomía, insensibilidad a factores antiproliferativos y resistencia a apoptosis conduce a la célula a un crecimiento independiente del medio. Pero para un crecimiento ilimitado es necesaria la evasión de la senescencia y la inmortalización, a través de la incapacitación de las proteínas supresoras de tumores pRb y p53, y el mantenimiento de los telómeros ([3973]). Las mutaciones en el gen p53 representan uno de los cambios genéticos más comunes identificados en el cáncer de mama. Además, las alteraciones de esta proteína están asociadas con una mayor agresividad de los tumores y con un peor pronóstico ([3144], [4595], [7683]). Por otro lado, la célula tumoral se caracteriza por una tasa de mutabilidad elevada por el aumento de la sensibilidad a agentes mutagénicos o mediante la alteración de los mecanismos reparadores del genoma, confiriendo así inestabilidad genómica. La pérdida del ADN telomérico en los tumores también genera una situación de inestabilidad genómica, en la que se producen amplificaciones y deleciones de segmentos cromosómicos. Los defectos en el mantenimiento del genoma y la reparación confieren ventajas selectivas, y por lo tanto útiles para la progresión tumoral ([7349], [7682]).

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

Análogamente, durante el crecimiento del tumor, éste necesita, además de la proliferación celular, una serie de reajustes del metabolismo para poder abastecer las necesidades energéticas

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

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

Por último, y en lo que respecta al cáncer de mama hereditario, éste constituye únicamente el 5-10% del total de cánceres mamarios ([4534]). Se han descrito diversos genes

que están relacionados con la susceptibilidad de un individuo de padecer este tipo de cáncer, señalando BRCA1 *-Breast Cancer 1-* y BRCA2 *-Breast Cancer 2-* como los principalmente implicados ([2522], [2586], [7687]). La mutación de BRCA1 en la línea germinal se ha identificado en el 15-20% de pacientes con historia familiar de cáncer de mama y en el 60-80% con historia familiar de cáncer de mama y ovario. BRCA1 codifica una proteína nuclear que funciona como un coactivador transcripcional. Ésta une a BRCA2, p53, RAD51 y otras proteínas involucradas en el ciclo celular y de respuesta al daño en el ADN. Células sin BRCA1 funcional no se paran en G₂ después de un daño en el ADN y son deficientes en la reparación acoplada a la transcripción. BRCA1 es parte del complejo RAD50-MRE11-p95, componente esencial de la reparación mediada por recombinación de las roturas del ADN de doble cadena ([4534], [4623]). En general, las mutaciones de pérdida de función de BRCA1 confieren un riesgo del 83% de desarrollar cáncer de mama y del 63% de cáncer de ovario antes de los 70 años ([2586], [2845]). Las mutaciones en BRCA2 se caracterizan por su asociación con un elevado riesgo de cáncer mamario en hombres ([2586], [7687]). El hecho de que las mutaciones en estos dos genes confieran en los hombres grados diferentes de riesgo de padecer cáncer de mama hace pensar en que puedan estar regulados por hormonas sexuales ([2586]). BRCA1 puede interactuar y actuar como coactivador del promotor del receptor de andrógenos, lo que explicaría porque la variación alélica en el receptor de andrógenos afectaría a la penetrancia del cáncer de mama en portadores de la mutación en BRCA1. BRCA2 estaría involucrada en la respuesta mediada por recombinación de la rotura de doble cadena de ADN y el mantenimiento de la integridad cromosómica. Asimismo, desempeña un papel en la segregación de los cromosomas ([4534], [4595], [4623]). De todas formas, no todos los casos hereditarios se explican por una alteración en alguno de estos genes, por lo que se cree que en el futuro se aislarán nuevos genes relacionados con esta patología.

3. FACTORES AMBIENTALES.

La incidencia del cáncer de mama presenta grandes diferencias geográficas ([3412], [4333], [4647]). Además, la tasa en poblaciones de baja incidencia que viajan a países de gran incidencia varía hasta asemejarse a las de la nueva región en 2-3 generaciones. Todo ello sugiere que además de los factores genéticos y endocrinos deben existir factores medioambientales y de estilo de vida implicados en el desarrollo del cáncer de mama ([4349], [4350], [4539], [4647]). De todos ellos, los nutricionales se consideran de gran trascendencia debido, en primer lugar, a la continua exposición o deficiencia a la cual puede estar sometida la

población por sus hábitos alimentarios y estilo de vida, y en segundo lugar, a la posibilidad de adoptar medidas preventivas basadas en este tipo de factores ([6093]).

Entre los numerosos componentes de la dieta que han sido relacionados con el cáncer de mama, los lípidos son de los más relevantes. En este sentido, existen numerosos estudios experimentales y epidemiológicos que han puesto de manifiesto la relación lípidos de la dieta y cáncer de mama, aunque algunos resultados, epidemiológicos principalmente, son controvertidos. En el caso de los estudios ecológicos por países, se ha hallado una asociación positiva entre el consumo de grasa *per capita* y las tasas de mortalidad por cáncer de mama. En estos estudios, los países con Dieta Mediterránea presentan valores intermedios para este cáncer. De la misma manera, los estudios de migración de poblaciones muestran que las poblaciones que migran entre áreas con distintas incidencias de cáncer de mama, tras una o dos generaciones, adquieren las tasas de mortalidad propias del país de destino. En cambio, en los estudios epidemiológicos analíticos, caso-control y prospectivos de cohortes, la relación no es tan clara. La agrupación de varios de ellos, mediante técnicas de metanálisis, ha permitido reanalizar los datos con mayor consistencia y, en algunos casos, la relación entre lípidos de la dieta y cáncer de mama ha quedado manifiesta ([868], [1660], [3840], [7692]). Además, recientemente, el proyecto EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) ha mostrado que la ingesta elevada de grasas, independientemente del tipo, está asociada con elevado riesgo de cáncer de mama ([6321]). Las discrepancias entre los distintos estudios podrían ser debidas a diversos motivos metodológicos, como el distinto número de efectivos y, principalmente, la limitación y/o sesgo de las herramientas de evaluación de la exposición dietética, las cuales alterarían la calidad de los datos recogidos en las poblaciones ([3562], [5963]). Resultados obtenidos por la *Woman's Health Initiative* (WHI), el mayor ensayo de intervención dietética realizado recientemente, han mostrado una reducción, cercana a la significación, de la incidencia del cancer de mama en los grupos que recibieron una dieta con baja cantidad de grasas en comparación al grupo control ([7146]). Sin embargo, está en discusión cómo estos estudios pueden distinguir entre los efectos producidos por una reducción de las grasas en la dieta y los efectos derivados de un aumento de la ingesta de frutas y verduras. Del mismo modo, continúa abierto el debate sobre cómo elucidar el mecanismo por el cual la reducción de las grasas en la dieta en edades tempranas puede reducir el riesgo de sufrir cáncer de mama décadas después ([3840]; [4802]; [7147]). Por tanto, actualmente la asociación entre lípidos de la dieta y cáncer de mama en las poblaciones humanas permanece todavía sin resolver.

Por otra parte, los estudios experimentales han mostrado claramente una asociación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. En este sentido, animales alimentados con dieta con elevada cantidad de grasa presentan mayor incidencia tumoral, más allá de la elevada ingesta calórica y del peso corporal. Asimismo, se ha descrito que los efectos de los lípidos de la dieta dependen no sólo de la cantidad sino también del tipo de grasa, el momento de su administración y el estado de diferenciación de la glándula mamaria ([3338], [5816], [7145]). En general, las dietas hiperlipídicas son fundamentalmente promotoras del cáncer de mama, aunque dietas con una misma cantidad de energía y contenido graso total difieren en su capacidad estimuladora según su composición en ácidos grasos ([2289], [4540]). Además, parece existir un requerimiento mínimo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a partir del cual el efecto de la grasa dependería de la cantidad total de lípidos de la dieta. Concretamente, por encima del 4-5% de PUFA, respecto al total de calorías, el rendimiento de la carcinogénesis por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) incrementa proporcionalmente a la cantidad de grasa total de la dieta, independientemente de que ésta sea de origen animal o vegetal ([2045], [3568]). En cuanto al efecto de las calorías, se ha demostrado una asociación positiva entre el aporte calórico de las dietas y las tasas de mortalidad por cáncer. Además, la restricción calórica tiene un efecto inhibitorio indiscriminado sobre la carcinogénesis, lo que sugiere un mecanismo de acción inespecífico ([3673]). Por tanto, una parte del efecto estimulador de las dietas ricas en grasas podría ser atribuido a su elevado contenido en calorías, aunque también existen mecanismos específicos por los cuales los lípidos de la dieta influyen en el cáncer de mama ([1962]). Un argumento que apoya esta conclusión es el hecho de que sólo ciertos tipos de tumores se estimulan por las dietas ricas en grasas. El diferente efecto de los distintos tipos de lípidos así como los mecanismos por los cuales modulan la carcinogénesis serán ampliamente discutidos en el apartado D de este capítulo.

Aunque otros factores nutricionales han sido relacionados en estudios experimentales con el cáncer de mama, epidemiológicamente los resultados no son totalmente concluyentes ([6093]). Así, se ha sugerido una posible disminución del riesgo de la carcinogénesis mamaria por efecto de proteínas de origen vegetal, fibra, vitaminas (A, C, carotenoides), licopeno, glucosinolatos e indoles, isoflavonas y lignanos, selenio, o metilxantinas, mientras que algunos trabajos han indicado un aumento del riesgo por efecto de dietas con elevadas cantidades de proteína animal (caseína) o azúcares simples ([7677]).

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

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

C. LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA.

Tal como ya se ha citado, numerosos estudios epidemiológicos y, fundamentalmente, experimentales, han puesto de manifiesto la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. De todos los componentes de la dieta que han estado relacionados con el cáncer de mama, los lípidos son los más relevantes. En general, los PUFA de la familia n-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n-6), presentes en aceites vegetales, son los principales estimuladores de la carcinogénesis ([1358], [3568], [3672], [4324]). Es de destacar el ácido γ -linolénico (18:3n-6) que supone una excepción dentro de esta familia, ya que posee propiedades antiproliferativas ([3980], [3982]). Además, el ácido linoleico conjugado (CLA), término en el que se engloban diversos isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, y que está presente en la carne y en los productos lácteos derivados de rumiantes, podría tener un efecto inhibidor del cáncer de mama ([2949], [3205]). Además, éste presenta propiedades

antidiabéticas, anticancerígenas y antioxidantes ([4538], [4543]). Por otro lado, los PUFA de la familia n-3, fundamentalmente el ácido α -linolénico (18:3n-3), y los de cadena larga, de origen marino, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), serían inhibidores del crecimiento tumoral mamario y la metástasis ([1486], [3568], [3615], [4324], [4353]). En cuanto a las grasas saturadas de procedencia animal, y los lípidos insaturados *trans*, que se originan tras los procesos de manufacturación de varios productos de aceites vegetales, también son promotores, pero menos potentes que las grasas poliinsaturadas de origen vegetal, y además, podrían actuar como co-carcinógenos durante la iniciación. Los lípidos insaturados *trans* se comportarían como los saturados en cuanto a la promoción de la carcinogénesis mamaria ([920], [1486], [3205]). Finalmente, el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados, fundamentalmente el ácido oleico (18:1n-9), presente en elevadas cantidades en el aceite de oliva, es de especial interés. Aunque cada vez existen más evidencias de un posible efecto quimiopreventivo del aceite de oliva virgen, experimentalmente existen resultados contradictorios, Así, se ha observado desde un efecto no promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama ([3568], [5321], [7144]). La Dieta Mediterránea, caracterizada por el elevado consumo de aceite de oliva, se asocia a una menor incidencia de ciertos cánceres, incluyendo el de mama, así como de enfermedades cardiovasculares ([4743], [6051]). La Dieta Mediterránea incluye la variedad de patrones dietéticos de las distintas regiones del Mediterráneo y se identifica por el abundante consumo de productos de origen vegetal (frutas, vegetales, cereales y frutos secos), productos frescos, pescado, y el ya mencionado aceite de oliva ([7107]). El aceite de oliva virgen extra corresponde al obtenido tras la primera prensada y se caracteriza por su riqueza en ácido oleico (72-84%), pero también por la presencia de abundantes compuestos minoritarios bioactivos, como escualeno y antioxidantes fenólicos (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína), secoiridoides, flavonoides y lignanos ([7105], [4399]). Actualmente, está bien establecido que el efecto potencialmente saludable del aceite de oliva virgen extra es debido tanto a su composición lipídica (especialmente su alto contenido en ácido oleico, su apropiado contenido en PUFA esenciales y su baja ratio PUFA n-6/PUFA n-3), como a sus compuestos minoritarios ([6302], [7159], [8018]). Las diferencias o contradicciones halladas entre distintos estudios sobre el efecto del aceite de oliva en el cáncer, así como la falta de una asociación significativa en algunos estudios epidemiológicos, podrían estar relacionadas con la utilización de los nutrientes químicamente definidos y aislados (ácido oleico y componentes minoritarios) o el alimento (aceite de oliva). Del mismo modo, la composición exacta del aceite de oliva difiere entre las distintas variedades. Ésta depende, no sólo del origen geográfico, sino también de otros factores

como las condiciones de cultivo en el correspondiente año de la recogida, el grado de maduración del fruto y el procedimiento técnico de procesado (prensado en frío, refinado) (45, 46). De hecho, las ratios entre ácidos grasos insaturados/saturados y ácido oleico/linoleico, y la composición de antioxidantes y otros compuestos minoritarios, serían factores clave en el efecto final del aceite de oliva en la carcinogénesis (47, 48). Por lo tanto, la relación entre consumo de aceite de oliva y cáncer de mama constituye un tema controvertido que podría tener importantes repercusiones en la salud humana, especialmente entre la población femenina ([3864]).

La influencia de los lípidos sobre la carcinogénesis mamaria parece ejercerse fundamentalmente durante la etapa de la promoción. Sin embargo, también existen evidencias de su posible papel durante la iniciación de la carcinogénesis, actuando como co-carcinógenos al facilitar la acción genotóxica de diversos agentes o como agentes protectores, dificultándola. Así, los lípidos podrían alterar la estructura de la cromatina y afectar la accesibilidad de carcinógenos, la reparación del ADN y/o el acceso de la maquinaria de transcripción a determinados genes ([1937]). En este sentido, estudios *in vitro* sugieren que las interacciones electrostáticas entre histonas y ADN pueden verse afectadas por interacciones con membranas nucleares que contienen fosfolípidos ácidos y esfingosina, modulando así la función de la maquinaria genética de replicación, transcripción y reparación del ADN ([2571], [2572]). Además, la presencia de fosfolípidos, fundamentalmente esfingomielina y fosfatidilserina, plasmalógenos y colesterol, como componentes de la cromatina, está actualmente bien documentada, y algunos estudios sugieren que estos lípidos nucleares podrían jugar papeles importantes en la regulación transcripcional que refleja el estado metabólico o de desarrollo de la célula ([4861]). Por otro lado, en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida en la rata con 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina (PhIP), se ha observado un aumento de los aductos carcinógeno-ADN en las células epiteliales mamarias de los animales alimentados con dieta hiperlipídica n-6 ([3581]). Además, la administración de diferentes tipos de dieta en las etapas previas a la hepatocarcinogénesis inducida con azoximetano en rata también sugiere un efecto sobre la iniciación de los PUFA n-6, pero no de los lípidos saturados ([4178]). En cambio, la exposición a CLA durante el período de maduración de la glándula mamaria en rata se ha demostrado que proporciona un efecto protector en la iniciación de la carcinogénesis ([3195]). Otros aspectos a considerar son la posible acción carcinogénica iniciadora de las sustancias acompañantes de las grasas, como contaminantes alimentarios, aditivos y hormonas, así como la posibilidad de que los lípidos

podieran activar determinadas sustancias exógenas carcinogénicas o modular la producción endógena de sustancias capaces de dañar el ADN ([860], [943], [1029]).

Los mecanismos por los cuales los lípidos de la dieta pueden actuar sobre el desarrollo del cáncer de mama no han sido totalmente dilucidados, pero a partir de los datos experimentales, éstos se podrían establecer a varios niveles, entre los que destacarían: 1) el crecimiento y maduración sexual, 2) el estatus hormonal, 3) las modificaciones de la membrana celular, 4) la transducción de señales, 5) la expresión génica, 6) la proliferación celular, 7) el sistema inmunitario y 8) el estrés oxidativo. Probablemente, *in vivo*, los lípidos actúen a través de todos estos mecanismos de una forma integrada, simultánea y/o secuencial.

1. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN SEXUAL.

Diversas evidencias epidemiológicas sugieren que determinados aspectos de la fertilidad y la maduración sexual se encuentran entre los factores de riesgo del cáncer de mama. Así, la nuliparidad (no tener descendencia) o un primer embarazo en edad avanzada constituyen factores de riesgo debido a que en estos casos la glándula mamaria no alcanzaría su máxima diferenciación, o bien la alcanzaría muy tarde. El avance de la pubertad (menarquia precoz) y la menopausia tardía también son factores de riesgo ya que aumentan el número total de ciclos reproductivos en los que la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución, lo cual influye en su susceptibilidad a la carcinogénesis. Además, en la menarquia precoz se induce una proliferación temprana de las células mamarias por exposición a elevados niveles hormonales ([5975], [6093], [6828], [7616], [7627]).

La pubertad está influida por factores hormonales, nutricionales y energéticos ([7620]). El desarrollo puberal se origina en el momento que el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal es completamente maduro ([7628]). La GnRH es la responsable, a nivel hipotalámico, de dicho eje ([7629], [7630], [7631], [7632], [7633]). Las etapas iniciales de la maduración sexual están mediadas por la aceleración de la secreción pulsátil de GnRH ([7634]). La generación de esta secreción pulsátil es el resultado del equilibrio dinámico entre señales hipotalámicas excitadoras e inhibitoras ([5907], [7633], [7637], [7653]). Además, las neuronas GnRH están controladas por el neuropéptido Kisspeptina, el cual, a través de su receptor, resulta clave en diversos aspectos de la maduración y la reproducción, desde la diferenciación sexual del cerebro y el inicio de la pubertad, hasta la regulación, ya en edad adulta, de la secreción de gonadotropinas y el control metabólico de la fertilidad ([7619], [7644], [7646], [7651]).

Es un hecho bien establecido que para que se inicie la pubertad y la reproducción se pueda llevar a cabo se requiere un depósito de energía suficiente y un estado metabólico adecuado ([5423], [5795], [5797]), por lo que los factores nutricionales pueden influir en dicho inicio. Las alteraciones en la homeostasis metabólica afectan al eje gonadotrópico y a la expresión de Kisspeptina en el hipotálamo ([5869]). De hecho, el tejido adiposo es dinámico y está en constante comunicación con otros tejidos relevantes, incluyendo los centros reguladores de la ingesta del cerebro ([7624]). Es, además, el principal lugar de producción periférica de estrógenos y al mismo tiempo secreta una serie de péptidos, las adipoquinas, que realizan funciones endocrinas relacionadas con el metabolismo y la reproducción ([6596]). Entre dichas adipoquinas se encuentra la Adiponectina, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y la Leptina ([7542], [7655], [7656]).

Leptina y Adiponectina regulan la secreción de GnRH ([7619]). La hormona Leptina, es producida principalmente en tejido adiposo y, en menor medida, en células epiteliales de la glándula mamaria, ovarios, estómago y placenta ([7542], [7622]). Sus niveles circulantes se correlacionan positivamente con el peso corporal y la cantidad de grasa ([7657], [7658]). La Leptina informa al hipotálamo de los niveles de reservas energéticas y adiposidad, el peso corporal y el estado nutricional, a la vez que participa en la regulación del apetito y la termogénesis ([5795], [5797], [6658], [7622]). Actualmente, está establecido que Leptina actuaría como un importante regulador del sistema hipotalámico de Kisspeptina y, por tanto, de la funcionalidad del eje reproductivo ([5796], [5869]). Además, la expresión del gen de la Leptina y su secreción, están reguladas, entre otros factores, por las hormonas esteroideas ([6661], [6966]). Así, los niveles de estradiol en plasma se han correlacionado positivamente con la cantidad de grasa corporal y los niveles circulantes de Leptina ([6683]). Por su parte, la hormona Adiponectina es sintetizada principalmente en el tejido adiposo y realiza sus funciones mediante la unión a su receptor AdipoR ([7541], [7542], [7553]). Está involucrada en el metabolismo lipídico y el mantenimiento de la energía homeostática, aunque a diferencia de las otras adipoquinas, sus niveles están inversamente correlacionados con el acúmulo central de grasa ([7663], [7666], [7667], [7670], [7658]). Por otra parte, ambas adipoquinas se han relacionado con otras funciones. Así, se ha atribuido a la Leptina un papel en el desarrollo epitelial de la glándula mamaria promoviendo la proliferación celular ([4865]). Además, se ha descrito expresión de su receptor en diversos tipos de tumores incluidos los de mama ([7663], [7668], [7669]). Adiponectina parece realizar una función opuesta a Leptina, es decir, inhibiría la proliferación celular. Por este motivo, los niveles de ambas adipoquinas y sus

respectivos receptores podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis mamaria ([7541], [7542], [7546]).

Existen evidencias de la influencia de los lípidos de la dieta en el crecimiento y maduración sexual. Una dieta con elevada cantidad de grasas puede producir el adelantamiento de la pubertad ([5975], [6093], [6828], [7616], [7664]). Este efecto, no obstante, parece depender del tipo de grasa consumida. Así, distintos tipos de grasas de la dieta pueden afectar de diferente manera al peso y masa corporal, influyendo a la vez en el metabolismo del tejido adiposo ([6599]). El mecanismo de este efecto diferencial podría estar directamente relacionado con las características de los ácidos grasos, como el tipo de estructura, la longitud de la cadena o el grado de insaturación (número de dobles enlaces) ([7475]). Estos datos estarían de acuerdo con estudios epidemiológicos que han asociado diferentes patrones dietéticos con el riesgo de desarrollar obesidad. En este sentido, la Dieta Mediterránea, cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva, ha sido inversamente asociada con la obesidad, a pesar del contenido relativamente elevado de grasa de esta dieta ([7102], [7625]). Uno de los mecanismos por los cuales el aceite de oliva podría tener efectos beneficiosos sobre el peso corporal sería a través de la molécula oleiletanolamida (OEA) ([7168], [7210]). La OEA es un ácido graso etanolamida, también conocido como N-aciletanolamida. Ésta familia de moléculas lipídicas señalizadoras se localiza principalmente en el intestino delgado, tejido adiposo, neuronas aferentes y en varias zonas del cerebro. Existe una fuente de OEA exógena, a través de la ingesta de nutrientes con ácido oleico, así como una fuente endógena. En este caso, se sintetiza a partir de fosfatidilcolina cuando las células son estimuladas por agentes despolarizantes, neurotransmisores y hormonas ([7168], [7178], [7206], [7218]). OEA juega un papel importante en el control central y periférico de la ingesta, que se produce de forma integrada con el control nervioso y hormonal de la saciedad ([7206], [7212], [7495]).

2. INFLUENCIA SOBRE EL ESTATUS HORMONAL.

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

Los lípidos de la dieta podrían estar implicados en la modificación de la disponibilidad de los estrógenos y, por lo tanto, estarían influyendo el desarrollo del cáncer de mama ya que es una patología hormonodependiente. Así, la alteración del metabolismo de los estrógenos es un posible mecanismo a través del cual los lípidos de la dieta podrían modificar el proceso carcinogénico mamario. Una ingesta elevada de grasas puede aumentar el tejido adiposo corporal y mamario, y, consecuentemente, también aumentaría la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, secretados por la glándula adrenal, a través de la enzima aromatasa P450. Esta enzima ha sido hallada en tejido mamario adiposo y tumoral ([824], [7689]). En el grupo de mujeres post-menopausicas el tejido adiposo se convierte en la principal fuente de estrógenos procedentes de dicha actividad aromatasa ([4595]). Por lo tanto, las mayores tasas de cáncer de mama observadas en mujeres post-menopáusicas y obesas ([5367], [5368]) podrían estar asociadas con un aumento de los niveles de estrógenos ([6823]).

Por otro lado, se ha descrito que los PUFA n-6 pueden aumentar la estrogenicidad a tres niveles: 1) por desplazamiento de los estrógenos de su proteína transportadora, incrementando los niveles de hormona libre; 2) aumentando la afinidad por su receptor; y 3) inhibiendo la actividad de la enzima 17β -deshidrogenasa e impidiendo, de esta forma, el paso de estradiol a estrona ([976], [3421], [3568]). Además, un incremento en el consumo de EPA, a través de la ingesta de pescado, disminuye la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂), un metabolito del ácido araquidónico que estimula la actividad de la aromatasa P450, lo cual disminuiría la producción local de estrógenos y el crecimiento estimulado por éstos ([4546]). Asimismo, el aumento de la ingesta de grasas causa un incremento de la secreción biliar, cuyos ácidos biliares y derivados del colesterol pueden ser transformados a estrógenos por ciertas bacterias de la flora intestinal ([1666]). En este sentido, la actividad moduladora de la biosíntesis de ácidos biliares característica del escualeno, componente minoritario del aceite de oliva virgen, podría contribuir al potencial efecto protector de este aceite en la carcinogénesis ([3619]). Por otro lado, los lignanos, otros componentes minoritarios del aceite de oliva virgen, presentarían efectos antiestrogénicos debido a su semejanza estructural con el estradiol y el antiestrógeno sintético tamoxifeno. Además, los lignanos inhiben la proliferación inducida por estradiol de células de cáncer mamario humano MCF-7, y estimulan la síntesis de la globulina transportadora de hormonas sexuales, con el subsecuente incremento del estradiol total. Sin embargo, los niveles de estradiol libre se reequilibran para mantener la homeostasis ([4743]).

A pesar de las relaciones sugeridas anteriormente, no se han encontrado diferencias claras en los niveles de esteroides gonadales por efecto de las dietas hiperlipídicas ([918], [934], [1046], [1678], [2265]).

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

Por otra parte, el efecto de los lípidos de la dieta podría estar relacionado con los receptores esteroideos. En ratas, una dieta rica en PUFA n-6 aumentó el nivel de RE en la glándula mamaria de animales vírgenes. En ratas gestantes, dicha dieta aumentó los niveles de RE, sin embargo, en la descendencia los niveles de RE en glándula mamaria disminuyeron significativamente, en asociación con una disminución de la diferenciación epitelial a favor de un mayor número de estructuras dianas de la transformación maligna ([3588]). Sin embargo, en otros estudios, la ingesta de dietas ricas en grasas no ha mostrado influencias sobre los niveles de receptores de estrógenos y progesterona ([1046], [5664]). Asimismo, se ha postulado que la obesidad afectaría el desarrollo del cáncer de mama en etapas tempranas en la tumorigénesis sin alterar el estado de receptores de estrógenos en el tumor ([5887]). Por tanto, no hay datos concluyentes sobre la influencia de los lípidos de la dieta y los receptores de esteroides gonadales ([1046], [2265]).

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

3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR.

La composición en lípidos polares (fosfolípidos, esfingomielina y cardiolipina en mitocondria) y el contenido en colesterol de las membranas celulares están finamente regulados por las células, y pueden variar en función de los lípidos que habitualmente se ingieren ([1047], [1518], [2264], [3185]). Las membranas celulares parecen mantener relativamente constante sus niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados dentro de un amplio rango de variación en la dieta de estos ácidos grasos. La composición de la membrana es más sensible a los niveles de PUFA n-6 y n-3 de la dieta, y especialmente a los PUFA n-3 y a la ratio n-3/n-6 ([4818], [6338]). Los cambios en el perfil lipídico de las

membranas celulares debidos al consumo de un tipo concreto de grasa pueden modificar el comportamiento celular mediante la influencia en la fluidez de la membrana, las vías de transducción de señales y el grado de peroxidación lipídica en dichas membranas ([4541]). Así, elevadas cantidades de PUFA n-6 en las membranas se han asociado a una mayor tasa de proliferación celular ([1355], [4324]).

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

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

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

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

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

4. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

Los lípidos de membrana, por la acción de varias fosfolipasas (PLA₂, PLC, PLD) activadas por complejos agonista-receptor, pueden generar gran cantidad de moléculas bioactivas que actúan como segundos mensajeros o como moduladores dentro de la cascada

de señalización intracelular ([2789], [4541]). Entre ellas, inositol-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (“free fatty acids”, FFA) que activan PKC, y ácido fosfatídico (PA) que, además, puede ser metabolizado a DAG. Asimismo, PA actuaría, como coactivador de la vía de MAPK junto con p21Ras ([2260], [2430], [3695], [3701]). Por lo tanto, los cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana que se puedan producir por modificaciones en la cantidad o el tipo de lípidos de la dieta, afectarán a la producción y composición de los segundos mensajeros, alterando la expresión génica y la función celular ([3947]). Se ha comprobado que algunas dietas hiperlipídicas incrementan el nivel de DAG y la cantidad de PKC asociada a la membrana ([1942], [2054]). Además, los FFA modifican las actividades de las fosfolipasas, PKC y otras quinasas, proteínas G, ciclasas, así como canales iónicos y la movilización del calcio ([2137], [2264], [2276], [2430], [2556]). Por el contrario, el ácido araquidónico inhibe algunas quinasas ([2137]). También se ha descrito que los PUFA oxidados inhiben tirosina fosfatasas (PTPasas), y por tanto incrementarían en general la fosforilación de tirosinas de las proteínas celulares. En trabajos *in vitro* se ha comprobado que determinados metabolitos del ácido linoleico pueden inhibir la defosforilación del EGFR, aumentando así la cascada de señalización intracelular ([3535], [3824], [5612]), aunque resultados obtenidos por el grupo investigador no muestran modificación de la activación de EGFR por los lípidos de la dieta, en los adenocarcinomas mamarios experimentales ([6879]).

Los lípidos de la dieta pueden afectar la actividad de las proteínas Ras, reguladores críticos de la función celular, como el crecimiento, diferenciación y apoptosis, aunque los mecanismos no son aún conocidos. En este sentido, en el modelo de cáncer de colon inducido con azoximetano, una dieta rica en aceite marino disminuyó el contenido de Ras unido a membrana, mientras que una dieta rica en aceite de maíz aumentó dicha localización sin alterar la farnesilación ni la palmitoilación de la proteína ([3355]). Otros autores han demostrado que los PUFA n-3, en comparación con los PUFA n-6, disminuyen la relación Ras membrana-citosol ([2955]). En relación al aceite de oliva, los compuestos minoritarios como el hidroxitirosol o el escualeno, pueden influir en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles de intermediarios lipídicos requeridos para la prenilación de Ras, necesaria para su activación en la membrana ([3229], ([3619], [3620], [3771], [5767])). En este sentido, el grupo investigador ha demostrado que las dietas ricas en aceite de oliva virgen regulan la activación de Ras disminuyéndola, pero no modifican su localización celular. Asimismo, también se produce la regulación de algunas de las principales vías de señalización de Ras, induciendo un balance proliferación/apoptosis a favor de esta última ([6879]).

En relación con la modulación del ciclo celular, algunos estudios sugieren que el incremento en la proliferación y en el número de células en fase S producido por un tratamiento con ácido linoleico resultaría de la modulación de las distintas vías MAPK existentes en la célula ([4542]). Otros trabajos han demostrado que los ácidos grasos de la familia n-6 reducirían la duración del ciclo celular, mientras que los de la familia n-3 inhibirían el crecimiento tumoral mamario ([3114], [3185], [3581], [4542]), y los monoinsaturados n-9, lo inhibirían a elevadas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones (<1 µg/ml) tendrían un efecto estimulador ([3569]).

Por otra parte, a partir de los fosfolípidos de membrana se producen FFA precursores de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos). Existen dos familias de eicosanoides; los derivados del ácido linoleico (n-6), vía ácido araquidónico, y los derivados del ácido linolénico (n-3), vía EPA ([3185]), que muestran diferentes efectos, en algunos casos, contrarios ([2050]). PGE₂, producto del ácido araquidónico, promovería la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular, y potenciaría la progresión tumoral, promoviendo la angiogénesis del tumor y las metástasis ([4324], [4546]). En este sentido, el efecto promotor tumoral de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama se ha correlacionado con una mayor producción de prostaglandinas ([1107]). Los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas bloquean parcialmente el efecto promotor de las dietas hiperlipídicas ricas en PUFA n-6 en la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA ([2245], [2265]). En relación a los lípidos n-3, CLA y ácido oleico, se ha postulado que su efecto protector se basaría en la utilización de las mismas enzimas de la síntesis de prostaglandinas que los n-6. Este hecho induciría un cambio en las proporciones del tipo de eicosanoides sintetizados ([3567], [3568], [3569], [4546]). Además, en el aceite de oliva, los compuestos minoritarios como el hidroxitirosol o el escualeno, también pueden influir en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles de intermediarios lipídicos, que en el caso del escualeno implicaría una disminución de la prenilación de Ras, necesaria para su activación ([3229], [3619], [3620], [3771], [5767]).

5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Numerosos trabajos han descrito que diferentes componentes de la dieta (PUFA, colesterol, glucosa/fructosa, determinados minerales y vitaminas liposolubles) pueden modular específicamente la transcripción génica, el procesamiento y la estabilidad de los

transcritos de genes implicados en diversas vías del metabolismo (glucólisis, lipogénesis, etc) ([2415], [2542], [4540]).

En relación a los lípidos, éstos podrían influir en la expresión génica de dos modos diferentes: un control directo, rápido y agudo de los niveles de expresión, y una modulación adaptativa a largo plazo de la composición de la membrana celular que podría modificar a su vez la señalización intracelular ([2415], [4540]). La modulación de la expresión génica por parte de los PUFA está bien caracterizada en el caso de los genes implicados en la lipogénesis hepática y otras vías metabólicas ([2545], [2547], [3929]). Así, los PUFA n-3 y n-6 inhiben la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados no tienen tal efecto ([2422], [2549], [2617]). Esta acción de los PUFA depende de una serie de condiciones: un contenido mínimo de 18 carbonos; un mínimo de 2 dobles enlaces localizados en las posiciones 9 y 12, uno de los cuales puede estar en configuración *trans*; y sufrir desaturación por la $\Delta 6$ -desaturasa ([2542]). También se ha constatado que los PUFA inducen la expresión de genes implicados en la oxidación lipídica y la termogénesis ([3844]).

Además, hay cada vez más evidencias de que los lípidos pueden regular la expresión de genes implicados en la transformación neoplásica. Trabajos *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares humanas de cáncer de mama tratadas con PUFA n-3 mostraron cambios en la expresión de genes implicados en apoptosis, señalización intercelular, comunicación celular, metabolismo o interacción con patógenos. Por el contrario, tal efecto no fue observado en el caso de los PUFA n-6 ([7154]). Por otra parte, la administración de ácido linoleico a células tumorales mamarias indujo cambios en la expresión del receptor de estrógenos α , la proteína G G13a, la p38 MAPK, así como de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la transcripción del ARN ([4542]). Los ácidos grasos insaturados han demostrado poder reducir significativamente el tiempo de duplicación de las células mamarias normales y tumorales en cultivo, provocando un aumento de la actividad mitótica ([918]). Este efecto se ha relacionado con una regulación de la expresión de genes implicados en el ciclo celular, como por ejemplo p53 y c-fos ([2227], [2272]).

Además, los ácidos grasos o sus metabolitos han demostrado poder controlar la actividad de algunos factores de transcripción, mediante su unión y activación de varios receptores nucleares, incluyendo la familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), el receptor X hepático (LXR) tipo α , el del ácido retinoico (RX) tipo α y el receptor nuclear hepático 4 (HNF-4) tipo α . Igualmente, los ácidos grasos pueden actuar

alterando la actividad o la abundancia nuclear de los factores de transcripción sin necesidad de unirse a ellos, como es el caso de 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*) y HIP-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*) ([4541], [4543]).

Datos propios del grupo de investigación demostraron que la dieta hiperlipídica PUFA n-6 disminuye la expresión del gen PCPH, implicado en la diferenciación de la glándula mamaria a través, al menos en parte, de una actuación sinérgica con Ras ([4811], [5321]). Además, la ingesta de dicha dieta aumenta los niveles de ARNm de β -Actina y de su transportador ZBP1, cuya desregulación se asocia con un fenotipo tumoral de mayor malignidad ([5965]).

El efecto promotor de las dietas ricas en PUFA n-6 en carcinogénesis mamaria y de colon también se ha asociado a la sobreexpresión de los genes ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. Por el contrario, las dietas hiperlipídicas PUFA n-3 ejercerían un efecto antitumoral a través de la inhibición de la expresión de COX-3 ([3616], [4324], [4546], [6769]). Algunos oncogenes y genes supresores de tumores, también pueden ser regulados por los ácidos grasos, directa o indirectamente. Entre ellos se encuentran ErbB2/Neu ([5149]), c-myc y c-Ha-ras ([1854], [2984]), c-fos y COX-2 ([5041]), p53, Bcl-2, Bcl-xL y Bak ([2272], [3012]) y BRCA1 y BRCA2 ([3857], [4325]) entre otros. La expresión de EZH2, una proteína nuclear modificadora de histonas, implicada en regular la conformación de la cromatina, también se ha encontrado influida por ácidos grasos pudiendo así ejercer un efecto sobre la regulación epigenética de la expresión génica ([7152], [7375]). Otros estudios han demostrado efectos sobre genes involucrados en angiogénesis, invasión y metástasis, como E-cadherina ([4401]), Maspina ([3983]) y algunas moléculas mediadoras de la cascada angiogénica como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el derivado de plaquetas (PDGF), el de fibroblastos (FGF), COX-2, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el factor de necrosis tumoral α (TNF α), metaloproteasas de matriz (MMPs) y β -Catenina ([7151]).

Los efectos inespecíficos de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama experimental, relacionados con su aporte energético, han sido asociados por el equipo investigador con la influencia que dichas dietas pueden ejercer en la regulación de la expresión de genes hepáticos como la carnitina palmitoil transferasa tipo 1 (CPT-1) y la sintasa HMG-CoA, implicados en el metabolismo lipídico. Los resultados obtenidos, junto

con los cambios observados en el perfil lipídico y el peso y masa corporal, sugieren que el cáncer modifica la regulación de dicho genes por los lípidos de la dieta, así como la expresión de PPAR α ([4743]).

En los últimos años, con la llegada de las técnicas de análisis de la expresión génica mediante *Microarrays*, se han publicado diversos trabajos sobre el efecto de los lípidos de la dieta en el perfil de expresión génica en células tumorales. El equipo investigador, utilizando dicha tecnología, identificó 4 genes diferencialmente expresados en cáncer de mama experimental por efecto de una dieta rica en PUFA n-6: α -2u globulina submaxilar, VDUP1 (*vitamin D3-upregulated protein 1*), el gen improntado H9 y un gen de función desconocida que codifica la secuencia de expresión (EST) Rn.32385. La regulación a la baja de estos genes en los tumores de los animales alimentados con dicha dieta se asoció con su mayor malignidad clínica y anatomopatológica ([4735]). En otros trabajos similares, los lípidos se han asociado con cambios en la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la transcripción del ARNm ([4542]), apoptosis, interacción huésped-patógeno, señalización y comunicación celular, transducción de señales y metabolismo ([7154]). En modelos de cáncer de próstata y de colon, dietas hiperlipídicas han mostrado influencia sobre la expresión de genes implicados en inflamación, metabolismo de ácidos grasos y glucosa, metabolismo de andrógenos y actividad de proteínas kinasas, así como de moléculas de la matriz intra- y extracelular, factores de crecimiento y genes de respuesta a andrógenos ([4895], [7149]).

Más recientemente, el grupo de investigación ha estudiado el efecto sobre la expresión de grupos de genes implicados en los distintos *hallmarks* de las células tumorales, descritos por Hanahan y Weinberg ([3973], [7349]). Los resultados han demostrado que las dietas ricas en PUFA n-6 disminuyen la expresión de genes implicados en vías de apoptosis y del sistema inmune, no sólo en la glándula mamaria sana sino también en los tumores. En cambio, las dietas ricas en aceites de oliva virgen extra aumentan la expresión de genes implicados en la apoptosis. Este diferente perfil de expresión inducido por ambos tipos de dieta se asocia con el diferente grado de malignidad de los tumores experimentales demostrado en cada caso.

6. EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.

Los lípidos de la dieta son capaces de modular la respuesta inmune y la producción de citoquinas inflamatorias. Asimismo existe una asociación entre el proceso inflamatorio y el

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

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

Los estudios sobre los efectos del aceite de oliva en el sistema inmune son escasos, pero los datos disponibles indican que éste podría ser un potente mediador de la respuesta inmune y que podría modificar la producción inflamatoria de citoquinas. La atenuación de estos procesos

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

7. ESTRÉS OXIDATIVO.

El daño en ADN, proteínas y lípidos inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) juega un papel muy importante en el desarrollo y la progresión de numerosos procesos patológicos incluido el cáncer. El daño oxidativo en el material genómico puede resultar en una parada o estimulación del proceso de replicación, en inducción de vías de transducción de señales, errores en la replicación o en inestabilidad genómica ([6196]). Del mismo modo, radicales libres y diferentes productos de la peroxidación lipídica pueden causar lesiones premutagénicas en el material genético de la célula. Un ejemplo de ello son los aductos formados por el aldehído malon-di-aldehído (MDA), o la base modificada 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), producto inespecífico de la oxidación ([6074], [6143]). Estas lesiones pueden ser reparadas o fijarse como mutaciones en el ADN colaborando así en la transformación de una célula sana en las etapas iniciales del cáncer, y/o ayudando durante la fase de promoción, donde se necesitaría de la continua presencia de un estímulo promotor tumoral, como podrían ser los radicales libres ([5845], [6446]). En la progresión del cáncer, que implica el paso desde un estado preneoplásico a un estado neoplásico, los radicales libres podrían tener un papel en la transducción de señales, así como en la capacidad invasiva y metastásica del tumor ([6430], [6434]).

Alteraciones en las enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa, Glutación Peroxidasa (GPx)) y en antioxidantes no enzimáticos (Glutación (GSH), vitamina C, Tiorredoxina (TRx)), así como en vías de señalización relacionadas, son comunes en muchos tipos de cáncer ([5812], [6456]) y en particular en cáncer de mama ([6083]). En general, se ha descrito una disminución de la capacidad antioxidante en las células tumorales respecto al tejido sano, lo que podría favorecer la formación de lesiones en el ADN, y conferiría a la

célula tumoral un fenotipo más agresivo y, por tanto, un peor pronóstico ([5845], [6456]). Resultados del equipo investigador han mostrado la pérdida de capacidad antioxidante en los tumores mamarios experimentales con respecto a la glándula mamaria normal. Sin embargo, existen discrepancias entre los numerosos estudios realizados ([6095], [6440]). Así, algunos autores han observado una correlación entre un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes con un peor pronóstico del cáncer, sugiriendo que dicho incremento protege a la célula de ser dañada por radicales libres y favorece la proliferación celular.

Con respecto a los estudios sobre la capacidad antioxidante no enzimática se ha observado que, tanto en humanos como en modelos experimentales, el resultado más frecuente es la disminución de los niveles de GSH y el aumento de la ratio GSSG/GSH como reflejo del estrés oxidativo en pacientes con cáncer o animales inducidos con carcinógeno ([6063], [6712], [6720], [6728], [6756]). Se han relacionado los bajos niveles de GSH con una menor proliferación del tejido mientras que el aumento de la ratio implicaría una situación de mayor estrés oxidativo ([6756], [6761]). Por el contrario, también se han encontrado altos niveles de glutatión en tumores mamarios como respuesta a la situación de elevado estrés oxidativo ocasionada por la enfermedad cancerosa ([6715]). Esta situación podría favorecer la proliferación y reducir la apoptosis de las células tumorales ([5879], [6759], [6760], [6764]). La regulación de la apoptosis mediante el estado redox, promoviendo proliferación en un medio reducido e induciendo apoptosis en un estado de oxidación, es un mecanismo que podría favorecer o interferir en el proceso carcinogénico en sus diferentes etapas ([6077], [6144]).

El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica juegan un papel importante en la carcinogénesis mediada por la nutrición. El estado redox de la célula puede ser modificado por el tipo de dieta. De hecho, la mayoría de antioxidantes no enzimáticos se adquieren a través de ella, como por ejemplo las vitaminas C y E, los compuestos polifenólicos, el selenio y los antioxidantes tiol, entre otros. Algunos estudios han demostrado los efectos sobre el estado redox de la célula de compuestos como los polifenoles del té negro, la fibra, pero sobretudo de los diferentes tipos de ácidos grasos ([3339], [6141]). Entre ellos, los PUFA n-3 podrían presentar un mayor efecto antioxidante debido, en parte, a la estimulación de la actividad enzimática de SOD, GPx y catalasa ([6692]). En relación al aceite de oliva virgen, éste debe su capacidad antioxidante a sus componentes minoritarios. Así, aceites de semillas enriquecidos con ácido oleico presentan los mismos efectos que un aceite de oliva refinado ([4631], [6611], [6692]).

Por otra parte, la ingesta de aceite de maíz, rico en PUFA n-6, supone un aumento del estrés oxidativo que podría afectar a las enzimas antioxidantes disminuyendo su nivel de actividad ([6753]). Encambio, se ha descrito que los polifenoles de origen dietético podrían favorecer el aumento de los niveles de GSH a través de la enzima γ -glutamilcisteina sintetasa puesto que se han encontrado regiones de elementos de respuesta antioxidante (ARE) en su región promotora ([6513]). Además, resultados propios del grupo han demostrado que la disminución de la capacidad antioxidante en los tumores mamarios es mayor en los animales alimentados con dietas hiperlipídicas respecto a la dieta control.

Existen múltiples estudios que describen los efectos prooxidantes y antioxidantes de dietas con diferente composición lipídica, como la influencia de diferentes componentes antioxidantes, como los polifenoles, sobre las etapas de la carcinogénesis. Estos estudios se han realizado mayoritariamente en modelos experimentales de cáncer de colon y hepático ([4904], [6762], [6770]). Referente al cáncer de mama se ha visto que los antioxidantes de la dieta, en general, son capaces de inducir una disminución de los niveles de glutatión en las células tumorales, asociada a un aumento de la apoptosis celular ([5879]).

D. MODELO EXPERIMENTAL.

Los experimentos *in vivo* son esenciales para el estudio de la patología mamaria. En este trabajo se escogió un modelo que utiliza ratas sobre las que se aplica un carcinógeno químico, el 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (Figura 5), capaz de provocar la aparición de tumores mamarios de características muy parecidas a las de los tumores humanos ([1438], [4264]).

La inducción tumoral se efectuó siguiendo el método de Huggins C *et al.* ([439], [443]) modificado ([1299]). Este carcinógeno, administrado por instilación buco-gástrica, presenta una serie de ventajas con relación a otros carcinógenos químicos, entre las que destacan: efectos extratumorales moderados (leucopenia, alteraciones del crecimiento), siempre y cuando la dosis no sea superior a la descrita (20 mg DMBA/animal); mortalidad post-inducción prácticamente nula; practicabilidad de la técnica; y alto rendimiento en la promoción específica de tumores mamarios con características similares a los humanos.

El DMBA (Figura 5) es un compuesto lipofílico que forma parte de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs), agentes xenobióticos derivados de la combustión incompleta de sustancias orgánicas. Ampliamente descritos como contaminantes ambientales con capacidad mutagénica y carcinogénica ([2388], [2629]), su relevancia en este campo será discutida en un apartado específico de esta Introducción (*Apartado E.1.*).

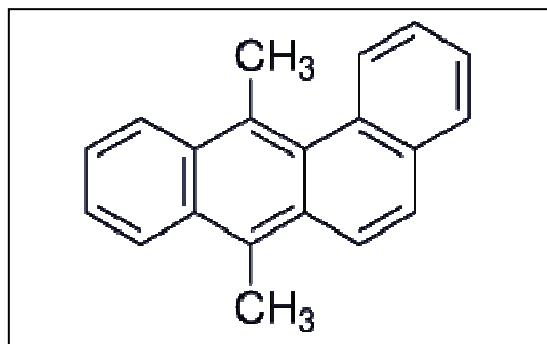


Figura 5. Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz(α)antraceno (DMBA).

El metabolismo general de los xenobióticos consta de dos fases, la primera de las cuales (fase I) consiste en la adición a estas moléculas lipofílicas de nuevos grupos funcionales (grupos hidroxilo, amino o carboxilo) que las hacen más polares, más reactivas y sensiblemente menos lipofílicas. Estos nuevos compuestos son especies químicamente reactivas capaces de interactuar con biomoléculas de la célula. En el caso de la fase I las principales reacciones son de hidroxilación, epoxidación, desalquilación, desaminación y S- y N- oxidación. Para ello, en su mayoría, las enzimas implicadas son citocromos P450 (*Cytochromes P450*, CYPs) y otras oxigenasas y deshidrogenasas ([2629], [8069]).

La segunda fase (fase II) consiste, en la mayoría de casos, en una unión covalente a moléculas endógenas de la célula tales como ácido glucurónico, glutatión, sulfatos y aminoácidos, dando lugar a derivados mucho más hidrosolubles que los originales y con una actividad toxicológica mucho menor. Son estos compuestos, en su mayoría, los que son excretados por el organismo a través de la orina, la bilis o el sudor. En el caso de la fase II las acciones de conjugación las llevan a cabo enzimas como las Glutathione S-transferasas (*Glutathione S-transferases*, GST), UDP-glucuronosiltransferasas (*UDP-Glucuronosyl*

transferases, UGT) o sulfotransferasas (*Sulfotransferases*, STs), entre otras ([6742], [7190], [8139]).

La fase I es la más específica para cada tipo de compuesto xenobiótico y la más relevante durante la formación de compuestos reactivos. En el caso concreto del DMBA, hasta el momento, se han descrito tres vías principales de metabolización/activación: 1) monoxigenación y formación de diol-epóxidos, 2) oxidación por transferencia de un electrón y formación de radicales catiónicos y 3) oxidación dependiente de NADPH y formación de *o*-quinonas ([6769]). Los complejos formados por la unión directa de los metabolitos generados por estas vías y el ADN, sin que se produzcan cambios estructurales en ninguna de las moléculas, constituyen los denominados aductos. Estos complejos pueden ser estables, y permanecer en el ADN, a menos que sean reparados por los mecanismos de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). Por otra parte, los aductos pueden ser depurinizantes, liberándose del ADN por ruptura del enlace glicosídico entre la base purínica y la desoxiribosa ([4080], [4081]). Si los aductos no son eliminados ni el ADN reparado, estos constituyen lesiones premutagénicas que preceden la iniciación tumoral ([4047]). Las distintas fases de metabolización del DMBA, en concreto la generación de compuestos reactivos y la formación de aductos DMBA-ADN, serán tratados en profundidad en los apartados *E.2.* y *E.3.* de este capítulo.

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

breve (20-40 días). En definitiva, la rata Sprague-Dawley (SD) es, por sus propiedades, una de las más utilizadas en las investigaciones oncológicas ([446]).

E. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS, INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA E INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA.

1. XENBIOTICOS. DESCRIPCIÓN E INFLUENCIA SOBRE LA SALUD.

Los Xenobióticos son un amplio y heterogéneo grupo de compuestos químicos externos al organismo (*exogenous chemicals compounds*, ECCs) que requieren ser metabolizados para poder eliminarse. Su naturaleza química es variada pudiendo ser compuestos aromáticos, cadenas alquílicas y compuestos halogenados. En todos los casos son de naturaleza lipofílica, lo que les confiere facilidad a la hora de atravesar las membranas celulares sin necesidad de transportadores. Estos compuestos pueden acceder al organismo a través de su ingestión, inhalación, por vía parenteral o a través de la piel. Además, tienden a acumularse en los entornos lipídicos del organismo ralentizando su velocidad de excreción. Estos compuestos son de muy diversos orígenes y comprenden desde pesticidas, fármacos, aditivos alimenticios, componentes de cosméticos, hasta contaminantes ambientales industriales y compuestos generados por la quema de combustibles ([7190]).

No todos los xenobióticos representan un riesgo para la salud, de hecho algunos de ellos son de gran utilidad y han sido utilizados por el hombre a lo largo de la historia, como es el caso de los fármacos. Sin embargo, un gran número de ellos pueden ser altamente tóxicos, teratogénicos y/o carcinogénicos, entre ellos, muchos de los contaminantes alimenticios, del aire y del agua. Los principales grupos de compuestos carcinogénicos y procarcinogénicos son hidrocarburos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs), compuestos nitrosos (*N-nitroso compounds*, NOCs), aminas aromáticas (*aromatic amines*, AAs), aminas aromáticas heterocíclicas (*heterocyclic aromatic amines*, HAAs), hidrocarburos aromáticos polihalogenados (*polyhalogenated aromatic hydrocarbons*, PHAHs), óxidos de etileno, dioxinas y otros organoclorados, pesticidas y biocidas, entre otros ([4874], [7190]; [8140]).

Un ejemplo claro del efecto perjudicial de estos compuestos son las enfermedades profesionales. Actualmente, los cánceres ocupacionales pueden representar entre el 10-20%

de todos los cánceres en hombres. Se han descrito 28 agentes químicos considerados como carcinógenos ocupacionales, 27 como probables y 113 como posibles carcinógenos ocupacionales ([8141]). Dentro de las sustancias peligrosas, los asbestos, los derivados del petróleo, como solventes, pinturas, tintes, gasolinas y otros, los aceites minerales y lubricantes así como otros múltiples compuestos contienen un gran número de ECCs directamente relacionados con la aparición de una gran diversidad de cánceres, entre ellos pulmón, hígado, riñón, esófago, leucemias, linfomas, páncreas, laringe y melanomas, entre otros ([8140], [8141]). Por otra parte, el tabaco es una fuente de más de 60 tipos conocidos de compuestos mutagénicos/iniciadores y/o promotores, algunos de ellos PAHs, NOCs, AAs, HAAs y óxidos de etileno. Su relación directa con un alto riesgo de cáncer de pulmón, esófago, laringe, faringe, páncreas, mama y colon, entre otros, es hoy día ampliamente conocida ([4874], [7190], [8140], [8141]).

Los xenobióticos pueden encontrarse también como contaminantes alimenticios debido a su acumulación procedente de la contaminación ambiental circundante, del uso de pesticidas o como resultado de su preparación a altas temperaturas (alimentos sobrecocinados o quemados) ([6850], [7190]). Nitratos, pesticidas y dioxinas pueden contaminar aguas y alimentos, debido a su amplia utilización en técnicas agrícolas. La exposición prolongada a aditivos alimenticios, incluyendo compuestos nitritos usados como conservantes y colorantes azoicos artificiales, así como la exposición a bisfenoles, compuestos derivados de los envases plásticos, puede derivar en una situación de riesgo ya que son sustancias mutagénicas y/o promotoras que además, pueden actuar como disruptores endocrinos interfiriendo en importantes procesos del ciclo celular. Asimismo, durante la preparación de alimentos a altas temperaturas pueden generarse múltiples compuestos derivados de la combustión incompleta de compuestos orgánicos como los PAHs y HAAs, con alta capacidad carcinogénica. En general, la exposición a ECCs presentes en los alimentos puede relacionarse con algunos cánceres como colon, estómago o mama, aunque en el momento actual es difícil de establecer una relación directa y clara entre la exposición ambiental y el cáncer debido a la existencia de a otros múltiples factores, entre ellos el metabolismo y susceptibilidad de cada individuo ([4874], [6850], [8140], [8141]).

El riesgo de exposición a los ECCs está directamente relacionado con el grado de desarrollo y evolución de las sociedades humanas, siendo los países en vías de desarrollo y los desarrollados los que presentan un mayor acúmulo de contaminantes en sus ambientes

urbanos. Algunos estudios han demostrado que la exposición prolongada a PAHs como consecuencia de la polución de grandes ciudades aumenta hasta en un 8% el riesgo de padecer cáncer de pulmón ([8140], [8141]). También se ha descrito una mayor susceptibilidad de los niños a la exposición de contaminantes ambientales, entre ellos los procedentes de la emisiones de la quema de combustibles, y se ha encontrado un aumento hasta del 4.7% del riesgo de leucemias en niños relacionado con la densidad del tráfico local ([8140], [8142]).

La complejidad del estudio de la influencia de los ECCs sobre el cáncer y otras enfermedades radica en su ubicuidad y la existencia de miles de compuestos que llegan a nuestro organismo formando *cocktails* que entran por diferentes vías. La incidencia de cáncer por los carcinógenos ambientales no sólo depende de la exposición si no que también está fuertemente influenciada por otros factores, entre ellos factores genéticos, edad, etnia, sexo, situación del sistema inmune, enfermedades pre-existentes y el estado nutricional. Según algunos autores, se ha estimado que eliminando los factores ambientales la incidencia del cáncer podría disminuirse entre un 80-90% ([8144]). Una posible práctica de prevención sería evitar las dos principales vías de exposición: la que el hombre realiza de forma activa, como el tabaco y la dieta, y reduciendo las exposiciones involuntarias ante ECCs presentes en el ambiente ([8144]). Una tercera vía, teniendo en cuenta que la exposición involuntaria es difícil de prevenir en muchos casos, es intentar modular el metabolismo de estos compuestos de forma que se disminuya su efecto carcinogénico dentro del organismo y se favorezca su rápida excreción. El metabolismo de estos compuestos y una de las posibles vías a través de las cuales podría modularse serán tratados en los sucesivos apartados de esta Introducción.

1.1. EFECTOS DE LOS XENOBIÓTICOS SOBRE LA CARCINOGENÉISIS.

El modelo mayormente asumido sobre el desarrollo de la carcinogénesis se divide en tres etapas o fases: iniciación, promoción y progresión. Dentro de este modelo, los factores ambientales pueden clasificarse como iniciadores, promotores y progresores. Los carcinógenos químicos iniciadores son capaces de producir una primera mutación en una célula que al dividirse puede dar lugar a la aparición de un clon inicial de células mutadas. Los compuestos cocarcinogénicos actúan facilitando el efecto del carcinógeno y/o dificultando la reparación de las lesiones generadas por este, actuando alrededor del tiempo de acción del carcinógeno. Un compuesto promotor y/o progresor es una sustancia no genotóxica capaz de producir expansión clonal de las células iniciadas, por ejemplo, capaz de inducir la proliferación o reducir la apoptosis, de manera que preserve la posibilidad de nuevos cambios

genéticos o epigenéticos, ayuda a la progresión de las células mutadas, y permite que células pre-malignizadas cambien de forma irreversible hacia células con un fenotipo completamente maligno ([7190]). Algunos ECCs iniciadores son los PAHs y otros derivados de hidrocarburos aromáticos, como nitrosaminas, aminas y compuestos nitrosos, así como compuestos peróxidos, alquilantes y arsenicales, capaces de generar daño en el ADN de forma directa o a través de moléculas activas producidas durante su metabolización. Ejemplos de compuestos promotores y progresores son los ésteres de forbol, como el 12-O-Tetradecanoil-forbol-13-acetate (TPA), cuyo mecanismo de acción consiste en la unión y activación de la PKC- α y la consiguiente activación de genes como *c-jun*, *c-fos*, *AP-1* (*Activator Protein-1*) y *NF- κ B*, que median proliferación celular y apoptosis. Otros ejemplos de compuestos promotores son algunos compuestos orgánicos peroxidados e incluso lípidos. En el mismo sentido a favor de la promoción, pentaclorofenol y PAHs de bajo peso molecular son capaces de interrumpir la comunicación intercelular por uniones *gap*. Este bloqueo entre tejido normal y pre-neoplásico podría crear un microentorno dentro de las células dañadas que les permitiría escapar al control del crecimiento y división que se produce en el tejido normal. Otros compuestos como bisfenol A, PHAHs y pesticidas, como ácidos fenoxiacéticos y clorofenoles, actúan sobre la promoción y progresión a través de sus efectos de disruptores endocrinos e inmunosupresores ([7190]). Existen ECCs carcinogénicos capaces de actuar sobre las tres fases de iniciación, promoción y progresión, mientras que hay otros que necesitan de una acción compartida con otros para llevar a cabo una malignización completa. En algunos casos, altas dosis de un único compuesto carcinogénico son capaces de acelerar el proceso actuando como iniciadores generando mutaciones, y como promotores pudiendo generar también citotoxicidad que estimularía la reparación y proliferación celular durante la regeneración del tejido ([7190], [8145]). Éste podría ser el caso del DMBA en el modelo experimental utilizado en este trabajo.

Además de la capacidad carcinogénica de un compuesto es importante el tipo de célula donde se genera el daño genotóxico o se promueve su división. En todos los tejidos existen varias poblaciones celulares, desde las células totalmente diferenciadas, las células comprometidas hacia su diferenciación y las células madre capaces de dividirse para generar nuevas células dirigidas a diferenciarse. Teniendo en cuenta esto, en el modelo iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis las distintas fases serán más o menos importantes según la célula original donde se produzca el daño en el ADN. Los aductos ECCs-ADN necesitan de la división celular para transformarse permanentemente hacia

mutaciones. Por lo tanto, serán más susceptibles las células con mayor actividad mitótica. Las mutaciones, dependiendo del tipo de célula en las que se produzcan y de la importancia del gen dañado, oncogenes y genes supresores, necesitarán de una segunda o más fases para generar nuevas modificaciones por sucesivas exposiciones, al mismo u otros compuestos mutagénicos, o por el propio sistema estocástico de la célula, que produce mutaciones espontáneas durante la división celular. Además, también se necesitará de otros factores exógenos o endógenos que actúen durante la promoción de estas células pre-malignizadas. Por lo general, una mutación inicial en una célula madre o poco diferenciada genera unos tumores más indiferenciados y agresivos, mientras que tumores menos agresivos y con crecimiento más lento proceden de células más diferenciadas ([1520], [2393], [8145], [8146]).

Asimismo, los ECCs se pueden clasificar en carcinógenos y cocarcinógenos. Mientras que los carcinógenos, como ya se ha descrito, son capaces de causar cáncer por sí mismos, actuando sobre la iniciación y/o la promoción y progresión, los cocarcinógenos son compuestos que pueden activar o aumentar el efecto de un compuesto carcinogénico. De acuerdo con este concepto, xenobióticos como PAHs, NOCs, AAs, HAAs, dioxinas, bifenilos policlorados (*polychlorinated biphenyls*, PCBs) y pesticidas organoclorados son considerados carcinógenos. En cambio, otros compuestos químicos de origen exógeno, así como algunos endógenos, de cualquier naturaleza se consideran cocarcinógenos si son capaces de ayudar o aumentar el efecto de un carcinógeno pudiendo, por ejemplo, modificar el apropiado metabolismo por parte de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (*xenobiotic metabolizing enzymes*, XMEs) de fase I y fase II o la inhibición de la reparación del ADN ([6936], [7190], [8147]).

En resumen, el efecto carcinogénico de un ECC no depende solo de su metabolismo, activación, generación de compuestos reactivos y capacidad promotora, sino también de la capacidad de respuesta del organismo, reparación del daño en el ADN, inducción de apoptosis y necrosis, presencia de alelos o mutaciones en genes que aumentan la susceptibilidad a ciertos tipos de cáncer y su capacidad, en general, de evitar el crecimiento y la progresión de una célula pre-malignizada. Por tanto, la susceptibilidad del propio individuo junto con la gran variabilidad de situaciones que puede generar la exposición a un ECC o un conjunto de ellos, hace que la carcinogénesis en general y la de origen químico en particular sea un proceso complejo, muy variable y de difícil aproximación *in vitro* e *in vivo*.

2. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS. FASE I Y FASE II.

La primera vez que se publicó el metabolismo de xenobióticos dividido en dos fase fue en 1959 por Williams RT ([8148]) quien propuso, tal como ya se ha explicado en el apartado C de esta Introducción, que en la fase I las reacciones llevadas a cabo principalmente por los CYPs producen la activación de los ECCs hacia compuestos más reactivos. En el caso de la mayoría de los fármacos, esta activación da lugar a la formación de compuestos con el efecto beneficioso para el organismo buscado, mientras que en el caso de algunos compuestos pre-carcinogénicos puede dar lugar a la formación de compuestos genotóxicos y/o citotóxicos. La segunda de las fases consiste en una serie de reacciones enzimáticas que en su mayoría producen la conjugación de los compuestos procedentes de la fase I con algunas moléculas endógenas de carácter polar que aumentan la hidrosolubilidad de estos compuestos originariamente lipofílicos y favorecen su excreción, además de reducir su capacidad reactiva. No todos los xenobióticos necesariamente sufren un proceso de fase I seguido de otro de fase II. El objetivo principal de las reacciones de biotransformación es el de modificar la hidrofobicidad de un compuesto de manera que se facilite su eliminación y, en ocasiones, tal objetivo se alcanza con sólo reacciones de fase I, sólo de fase II o ambas ([8139], [8149]).

El principal órgano metabolizador de xenobióticos es el hígado, debido a su mayor concentración y diversidad de XMEs. Alrededor del 70% de los CYPs presentes en el hígado son de la familias 1, 2 y 3, los cuales metabolizan la mayoría de compuestos exógenos. Otros órganos de menor importancia son el intestino, el pulmón, el riñón o la piel ([8069], [8149]). En todos los tejidos en los que se produce metabolismo de xenobióticos para la obtención de detoxificación en lugar de toxicidad se necesita que la actuación de las enzimas de fase I esté estrechamente acoplada con la actividad de las enzimas de fase II. De esta forma una ausencia o pérdida de compenetración puede resultar en una mayor formación de compuestos reactivos y de estrés oxidativo. Además, en el organismo, la actividad de las distintas enzimas de fase I y II dependerá de su contenido dentro de los diferentes tejidos. De esta forma, la activación/detoxificación de los distintos xenobiotóxicos, así como su efecto carcinogénico en el tejido diana, dependerá del método de administración o de entrada en el organismo de los distintos compuestos ([7190], [8145]). Asimismo, dentro de la complejidad del metabolismo hay que tener en cuenta la actividad de los transportadores de membrana de compuestos exógenos, tales como los ABC, familia de los *ATP binding cassette*, importantes en

situaciones como la resistencia a fármacos, y cuya importancia y función en el metabolismo de compuestos carcinogénicos exógenos aún está por dilucidar ([7190], [8145], [8150]).

2.1. ENZIMAS IMPLICADAS.

Entre las XMEs implicadas en el metabolismo de fase I capaces de detoxificar o activar metabólicamente ECCs se encuentran las mono-oxigenasas de la familia de los CYPs, que representan entre el 70-80 % de las XMEs de la fase I, además de otras como oxido-reductasas, epóxidohidrolasas, como *Epoxide hydrolase 1* (EH1), y peroxidasas, como *Myeloperoxidase* (MPO). La superfamilia de los CYPs es un grupo de hemoproteínas catalíticas que incluye más de 2000 isoformas conocidas en diferentes especies; están divididas en más de 37 familias, 12 de las cuales son comunes a todas las especies de mamíferos, y se dividen en un total de 22 subfamilias (Figura 6). De todas ellas, las familias CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 y CYP7 son las principalmente involucradas en el metabolismo hepático y extrahepático de los xenobióticos, pudiendo tanto detoxificar como activar un gran número de compuesto exógenos carcinogénicos y pro-carcinogénicos, así como fármacos y otras sustancias. Especialmente, las familias CYP1 y CYP2 están implicadas en el metabolismo de la mayoría de compuestos aromáticos carcinogénicos y las CYP1, CYP2 y CYP3 son específicas de la mayor parte de fármacos. El resto de miembros de la familia de los CYPs, sin excluir los anteriormente mencionados, están implicados en el metabolismo de sustancias endógenas como esteroides sexuales, corticosteroides, ácidos biliares, ácidos grasos o ácidos retinoicos ([8069], [8139], [8149], [8150]).

Una de las características más significativas de los CYPs es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un gran número de sustratos. Esto es debido a la existencia de múltiples formas de la enzima, cada una de las cuales está adaptada al metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente ([8069]). Las oxidaciones catalizadas por los CYPs son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH y en las que se necesita oxígeno molecular (O₂). Los CYPs son capaces de catalizar reacciones de oxidación principalmente, pero también de reducción, hidratación e hidrólisis. Son proteínas que forman parte de la región microsomal de la célula, se encuentran ancladas a las membranas intracelulares, retículo endoplasmático, con la mayor parte de la proteína situada en la región citosólica de la membrana. La mayoría de CYPs forman una agrupación con otras proteínas, como citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH (*NADPH-*

dependent cytochrome P450 reductase, CPR) y citocromo b5, para establecer una transferencia de electrones desde el NADPH y reducir las moléculas de O₂ ([8069]).

La implicación de los CYPs en el metabolismo de xenobióticos estaría relacionada con los procesos de iniciación/promoción de la carcinogénesis, mientras que el metabolismo de compuestos endógenos podría estar relacionado con procesos de promoción tumoral ([7190]).

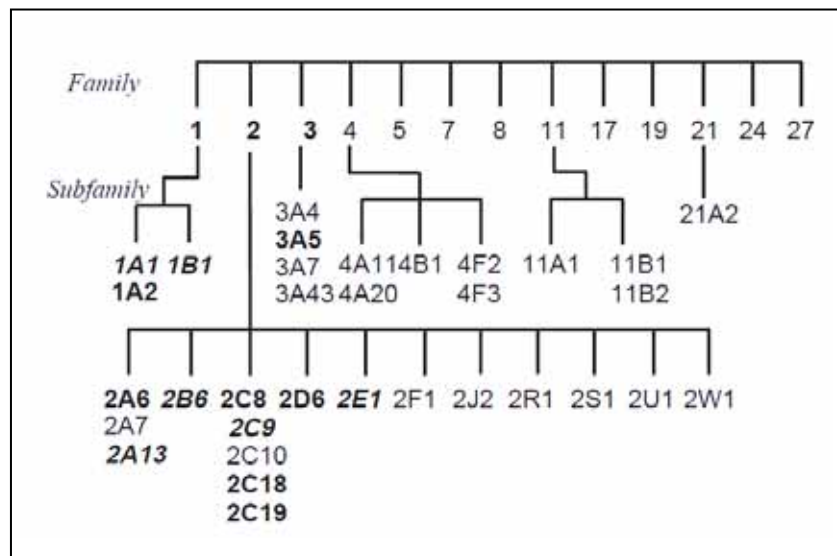


Figura 6: Nomenclatura y clasificación de los principales CYPs en humanos. La clasificación de los genes CYPs en familias y subfamilias se basa en el grado de homología existente en la secuencia de aminoácidos. Marcados en negrita están los principales genes implicados en el metabolismo de xenobióticos ([8149]).

Las reacciones pertenecientes a la fase II son reacciones de conjugación con sulfatos, ácido glucurónico, ácido mercaptúrico, metilos y acetilaciones. Estos compuestos conjugados son normalmente mucho menos tóxicos que los producidos durante la fase I. Las principales reacciones que se encuentran en la fase II son glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación con glutatión y/o con aminoácidos. Los productos formados son típicamente más hidrofílicos y por lo tanto más fácilmente excretables. Las principales familias de enzimas implicadas en el metabolismo de la fase II son UGTs, STs, N-acetiltransferasas (*N-acetyltransferases*, NATs), y GSTs, además de algunas metiltransferasas como S-metil transferasas y O-metil transferasas. También formarían parte de esta fase algunas flavoproteínas como NQO1 (*NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1*) que cataliza la

reducción de compuestos quinona hasta hidroquinonas contribuyendo en su detoxificación metabólica, sin necesidad de conjugarlos con otras sustancias endógenas. En general, se ha observado que las reacciones pertenecientes a la fase II se caracterizan por una alta capacidad metabólica pero por una baja afinidad por los substratos xenobióticos, como en el caso de las GSTs, o por una alta afinidad pero baja capacidad metabólica, como en el caso de las STs ([8139], [8150]).

Se ha propuesto la existencia de una tercera fase (fase III) durante el metabolismo de xenobióticos recientemente añadida al complejo metabolismo de los compuestos exógenos. Hace referencia a los transportadores de membrana activos que son responsables del tránsito de fármacos y otros xenobióticos a través de la membrana celular. Los primeros transportadores descritos para esta fase III fueron la familia de los ABCs. Muchos de estos receptores de membrana son responsables de la resistencia a fármacos observada en algunas enfermedades, siendo un claro ejemplo la multi-resistencia a fármacos observada en el proceso de evolución de muchos tipos de cáncer. Otros transportadores importantes dentro de estos procesos son los transportadores de aniones y de cationes orgánicos de la superfamilia de los SLC22A y también la superfamilia de los *organic anion-transporting polypeptides* (SLCO). En el caso de este tercer grupo, se están realizando muchos estudios para determinar factores importantes sobre su regulación transcripcional en órganos importantes del metabolismo como el hígado, el riñón y el sistema nervioso ([8139]).

El organismo a lo largo de la evolución ha desarrollado mecanismos de defensa, metabolización, excreción y reparación del DNA, ante la exposición a xenobióticos de origen natural. Estos sistemas de defensa podrían encontrarse saturados frente a la gran cantidad y diversidad de nuevos compuestos químicos que se han acumulado a lo largo de pocas décadas en el ambiente. Dado que el organismo podría no metabolizar e inactivar apropiadamente todos los compuestos exógenos apolares, algunos contaminantes ambientales lipofílicos con carácter carcinogénico podrían bioacumularse en el tejido adiposo ([8152]). Se ha demostrado experimentalmente que en los adipocitos se acumulan compuestos exógenos carcinogénicos, como dioxinas y PAHs, y que estos se pueden liberar durante la lipólisis ([8151]).

Por lo general, muchas enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos pueden variar su actividad y expresión debido a factores genéticos, fisiopatológicos, ambientales, situaciones hormonales y la dieta. Así, sus niveles hepáticos y extrahepáticos pueden variar entre diferentes individuos lo que explicaría las diferencias interindividuales en

la respuesta a fármacos, tóxicos y carcinógenos. Todo ello hace más complicada la determinación del riesgo de cáncer asociado a exposiciones ambientales ([7905], [8069]).

2.2. REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS.

La expresión de las distintas XMEs está regulada por un amplio grupo de factores de transcripción, responsables de las variaciones de los niveles de ARN mensajero (ARNm) ante la exposición a diferentes ECCs. Se conocen diversas clases de xenobióticos con capacidad para inducir o aumentar la transcripción de los genes responsables de su propia biotransformación y transporte en el organismo de mamíferos. Algunos de los principales receptores de xenobióticos son miembros de la gran familia de receptores nucleares no esteroideos, como el Receptor Constitutivo de Androstano (*Constitutive androstane receptor*, CAR), el Receptor de Pregnano X. (*Pregnane X receptor*, PXR) y los Receptores Activados por los Proliferadores Peroxisomales (*Peroxisome proliferator activated receptor*, PPARs). Otros factores de transcripción que funcionan como receptores de xenobióticos son el Receptor de Aril-Hidrocarburos (*Aryl Hydrocarbon Receptor*, AhR) (Figura 7) y el *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-Like 2* (NFE2L2 o Nrf2), que principalmente regula la expresión de XMEs de la fase II ([8139]; [8150]). A continuación se detallan las características de estos principales factores de transcripción.

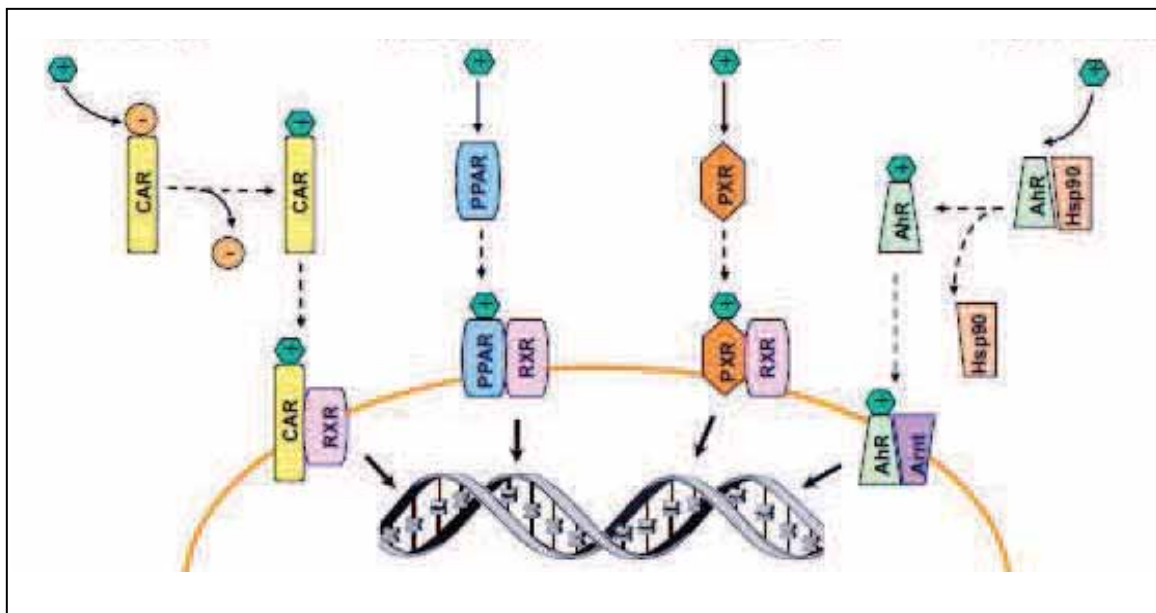


Figura 7: Mecanismos generales de la inducción de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs). CAR, *Constitutive androstane receptor*; PXR, *Pregnane X receptor*; PPARs, *Peroxisome proliferator activated receptor*; AhR, *Aryl Hydrocarbon Receptor*; RXR, *Retinoid X receptor*; Hsp90, *Heat shock protein 90*. ([8149]).

AhR (BHLHE76):

AhR es un miembro de la superfamilia de factores de transcripción *basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS)*. Los miembros de esta superfamilia contienen dos dominios funcionales altamente conservados. El primero de ellos es la *basic-region (b)*, implicada en el reconocimiento de la proteína con el ADN. El segundo es el *helix-loop-helix (HLH)*, que consiste en dos hélices alfa separadas por un *loop* o lazo y cuya función es facilitar la interacción proteína-proteína. El conjunto bHLH se encuentra localizado en la región N-terminal de la proteína. Además, AhR contiene dos dominios *Per-Arnt-Sim (PAS)*, que son regiones de 200-350 aminoácidos que presentan una alta homología de secuencia con otros dominios de proteínas descritas por primera vez en *Drosophila (period, Per; aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT; y single-minded, Sim)*. Estos dominios PAS son responsables de la interacción de estas proteínas con otras que también contienen dominios PAS, como es el caso de AhR con ARNT. De esta manera, se pueden formar complejos de proteínas homólogas o heterólogas. El sitio de unión al ligando de AhR se encuentra dentro de uno de los dominios PAS y contiene una secuencia de aminoácidos conservada, responsable de la afinidad por los distintos tipos de compuestos capaces de unirse. Finalmente, AhR contiene un dominio *Q-rich*, rico en glutamina, localizado en la región C-terminal y relacionado con el reclutamiento de co-activadores y transactivadores ([7391], [7850], [8077], [8104], [8139], [8153]).

AhR se encuentra unido a las *heat shock protein 90 (Hsp90)* y a *X-associated protein 2 (XAP2)* en el citoplasma en su forma inactiva. Cuando un ligando se une al receptor de AhR, este complejo se transloca al núcleo donde ARNT desplaza a Hsp90 y heterodimeriza con AhR ([8077]). El complejo AhR-ARNT se une a las regiones *xenobiotic response element (XRE)*, también conocidas como *dioxin response elements (DRE)*, en la región promotora de un amplio número de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos, como CYP1s, UGT1A1, NQO1 y MDR1, además de genes implicados en crecimiento y diferenciación celular, como *Ereg* y *Snai2* ([8077], [8139]).

AhR es considerado un receptor promiscuo, capaz de unir un gran número de estructuras químicas diversas ([7173], [7853]). Entre los ligandos con mayor capacidad de activación de AhR se encuentran los PAHs y las HAAs. La estructura química requerida de los ligandos típicos de AhR es rectangular, plana e hidrofóbica con dimensiones máximas de 14 x 12 x 5 Å ([7173], [7415], [8139]). Muchos de los compuestos naturales ligandos de AhR,

por ejemplo flavonoides y tetrapirroles, presentan una hidrofobicidad y una afinidad intermedias ([7853], [7854], [8023]). Existen diferencias entre especies con respecto a la afinidad de los distintos ligandos de AhR. Algunos estudios sobre AhR en humanos han revelado una mutación en la región de la proteína de unión al ligando (posición 381). El cambio de un residuo de alanina en el ratón por una valina en el hombre ([8154]) disminuye en humanos la afinidad de este receptor por el TCDD (*2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin*) del orden de 10 veces con respecto al AhR de ratón, mientras que aumenta la afinidad de otros compuestos como los derivados indoles ([8139]). El número de ligandos descritos para AhR continua creciendo y parece que en la dieta pueden encontrarse una plétora de compuestos capaces de unir y activar AhR ([7173], [7853]).

Las funciones fisiológicas de AhR continúan siendo un área de estudio en desarrollo. Las primeras pistas sobre su importancia en otras vías más allá del metabolismo de xenobióticos se obtuvieron al observar el efecto en ratones *AhR-null*, sin capacidad para expresar AhR. Éstos mostraron defectos en varios sistemas, tales como disfunciones en el sistema inmune, pobre desarrollo vascular en el hígado, defectos cardiovasculares y reducida fecundidad ([8078], [8104], [8139]). Del mismo modo, en otros estudios *in vivo* e *in vitro*, la sobreactivación continuada de AhR por algunos ligandos como el TCDD, ha implicado efectos inmuno-, hepato- y cardiotóxicos además de teratogénesis, disrupción endocrina, síndrome de emaciación, diabetes y carcinogénesis, entre otros. Éstos efectos se han asociado a la interacción de AhR con otras múltiples vías celulares y factores de transcripción como ER (*estrogen receptor*), NFκB, AP-1, STAT-3, pRB y Nrf2 (Figura 8) ([7176], [8077], [8104], [8139]).

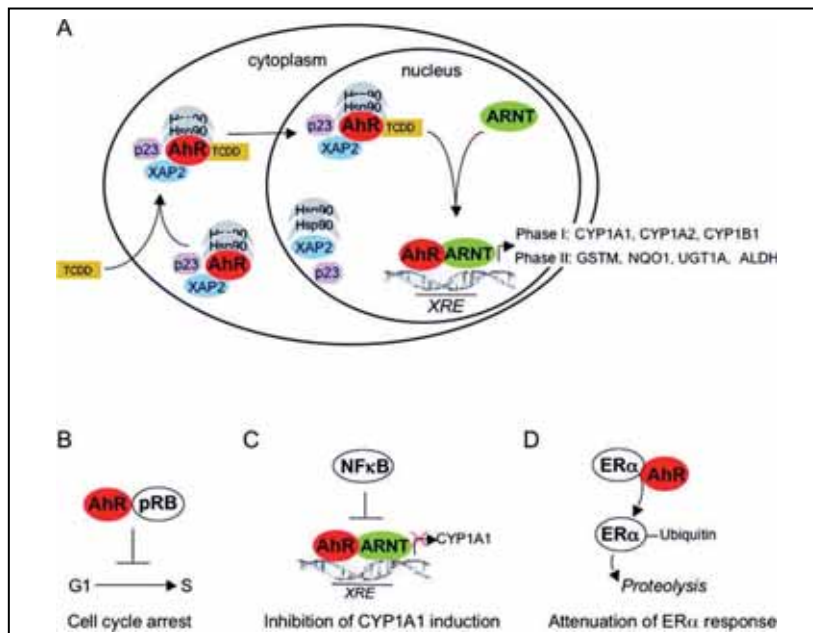


Figura 8. Vías de señalización canónicas (A) y no canónicas (B,C y D) de AhR ([7176]).

AhR y progresión del cáncer.

El efecto de AhR sobre la expresión de muchos enzimas implicados en el metabolismo de compuestos carcinogénicos capaces de interaccionar con el ADN, ha colocado a dicho factor de transcripción en una situación central en el proceso de iniciación de la carcinogénesis. En cambio, su influencia sobre la promoción y la progresión hacia un fenotipo metastásico es más difícil de explicar ([8139]).

La activación de AhR, por parte de PAHs, PHAHs y ligandos no mutagénicos, conlleva la inducción de los CYP1s, y la consiguiente formación de metabolitos más activos con efecto carcinogénico iniciador y/o promotor ([7002], [7190], [8155]). Además, estos CYP1 pueden generar estrés oxidativo de forma independiente por la formación de especies reactivas de oxígeno, lo que explicaría porqué algunas dioxinas tienen un efecto mutagénico de forma indirecta, ejerciendo por tanto una acción iniciadora además de la promotora ([8158]). Una de las principales dioxinas estudiada por sus efectos promotores de la carcinogénesis es la TCDD, un xenobiótico no mutagénico capaz de unirse a AhR pero que no puede ser metabolizado por los CYP1s. Este hecho aumenta su vida media dentro del organismo, que puede llegar a ser de hasta varios años en algunas especies, entre ellas el hombre. Además, tiene capacidad de acumularse en el hígado y el tejido adiposo. Esta vida

media larga en el organismo le confiere un margen muy amplio de activación permanente de AhR que determina su capacidad carcinogénica a través de la actividad desregulada de este receptor ([8159], [8160]). De todas formas, el efecto carcinogénico o protector por la activación de AhR no está claro ya que también promueve la expresión de enzimas de la fase II como UGTs, GSTs y NQO1 ([6554], [7415]). Por otro lado, varias interacciones intracelulares de AhR y ARNT con otros factores de transcripción como *retinoblastoma protein 1* (pRb1), NF- κ B, ER α , y SP-1, podrían estar implicadas en la respuesta del organismo ante la sobreactivación de este factor de transcripción. Existen evidencias de que AhR podría regular una batería de genes que contribuyen al avance de las células tumorales hacia un fenotipo metastático. Entre ellos se encuentran genes como *Slug*, MMP-9, MMP-1, ABCG2/BCRP, FASCIN-1, *Nedd9*, COX2, VAV3, IL6 y Ube213 ([8077], [8078], [8104], [8139]). Del mismo modo, existen diferentes coactivadores y represores que pueden modificar la actividad transcripcional del complejo AhR-ARNT, estimulando una respuesta agonista o antagonista ([7854], [8023], [8153]).

En resumen, la activación de AhR puede contribuir mediante tres vías diferentes a la carcinogénesis inducida por un compuesto exógeno. La primera de ellas, mediante la activación de un compuesto procarcinogénico hacia un derivado carcinogénico a través de su metabolismo por los CYP1s. La segunda, debida a la generación de compuestos reactivos de oxígeno como resultado de la estimulación de los CYPs. Y la tercera de ellas, mediante el efecto promotor de AhR por la activación de genes relacionados con proliferación, regulación del ciclo celular y apoptosis. Asimismo, factores tales como los niveles de expresión de AhR y de las XMEs de forma constitutiva en cada tejido, la afinidad de los ECCs por AhR, su capacidad agonista, y su velocidad de degradación y/o de acumulación en el organismo, pueden afectar al proceso carcinogénico.

Nrf2 (NFE2L2):

El factor de transcripción Nrf2 es de tipo *cap'n'collar/Basic-region leucine zipper* (CNC/bZIP), que influye sobre la respuesta intrínseca frente a la exposición a estrés oxidativo y compuestos xenobióticos. Nrf2 está ampliamente expresado en todos los tejidos en ratón y humanos. En su forma inactiva se encuentra en el citoplasma celular unido a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), proteína que sirve de unión con la *E3 ubiquitin ligase* que favorece la ubiquitinización de Nrf2 y su degradación. A su vez es responsable de su activación debido a que Keap1 actúa como sensor de compuestos químicos que interaccionan

con algunos residuos cisteína facilitando la liberación/activación de Nrf2 y su translocación al núcleo (Figura 9) ([7413], [8084], [8161]).

Dentro de los inductores químicos del complejo Nrf2-Keap1 se encuentran numerosos compuestos producidos como consecuencia de, o generadores de, diferentes tipos de estrés celular (estrés oxidativo, estrés de zizalla *-shear stress-*, o del retículo endoplasmático) tanto de origen endógeno como exógeno. Se han clasificado en 10 familias o grupos de compuestos: 1) difenoles oxidables, diaminobencenos y quinonas; 2) aceptores de reacciones nucleofílicas de tipo *Michael*; 3) Isiotiocianatos y sulfoxitiocarbamatos; 4) tiocarbamatos; 5) ditioneonas; 6) conjugados polienos; 7) hidroxiperóxidos; 8) arsenicales trivalentes; 9) metales pesados; y 10) dimercaptanos vecinales ([7392], [8084]).

Cuando Nrf2 se activa transloca al núcleo y se une al ADN formando un heterodímero con los cofactores *small musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf) (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014). El complejo Nrf2-sMaf se une en el ADN en las regiones *antioxidant response element* (ARE), también llamadas *electrophile response element* (EpRE). En estas regiones ARE, además de Nrf2 han sido descritos otros factores de transcripción capaces de unirse a ellas como son RAR α , PPAR γ , ER α , ERR β y algunos miembros de la superfamilia AP-1 ([7413], [8084], [8162], [8163]).

Nrf2 es capaz de regular la expresión génica de proteínas implicadas en la fase II del metabolismo de xenobióticos, como las GSTs, STs, UGTs y NQO1, las cuales también participan en la inactivación no sólo de compuestos exógenos activados sino también de compuestos reactivos que afectan al estrés oxidativo celular ([8084], [8161]). A su vez, Nrf2 también parece modular algunas de las enzimas de la fase I como CYP1B1 y de los transportadores de membrana de la familia de los ABCs ([8164]). Además, regula muchas de las enzimas implicadas en el sistema antioxidante endógeno, controlando proteínas que participan en la homeostasis de glutatión, en su biosíntesis, y en su oxidación y reducción a través de GPx y GSR, así como enzimas implicadas en la reducción de tioles de proteínas oxidadas ([8164]). Dado que muchas enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos y el estrés oxidativo necesitan de NADPH como cofactor, Nrf2 también es capaz de regular enzimas productoras de NADPH como la *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD), la *6-phosphogluconate dehydrogenase* (PGD), la *isocitrate dehydrogenase 1* (IDH1) y la *malic enzyme 1* (ME1) ([8164]).

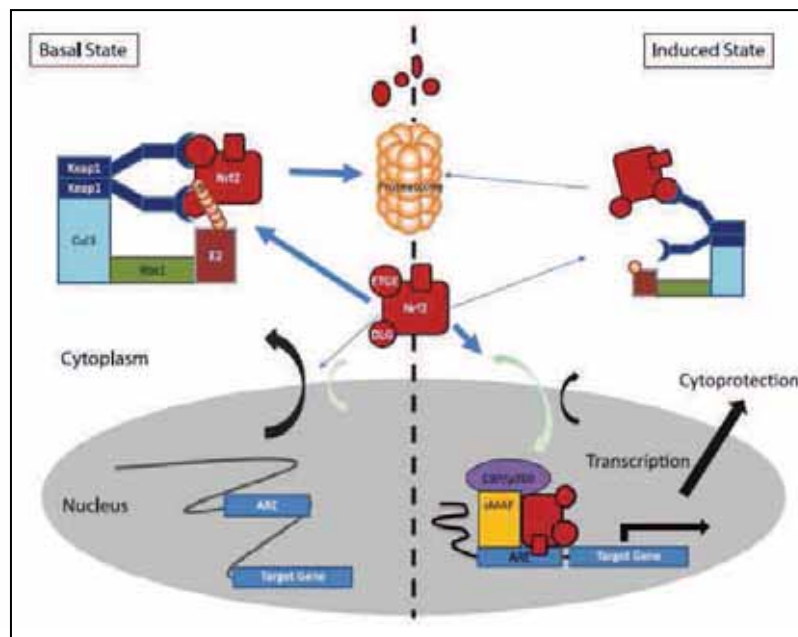


Figura 9: Interacción Keap1-Nrf2 ([7414]).

Algunos autores han detectado dos regiones en Nrf2, una en el dominio ZIP (*leucine zipper domain*) responsable de una respuesta canónica insensible a redox de señal de exportación al núcleo (NES, *nuclear export signal*) y también una señal de exportación al núcleo dependiente de redox dentro del dominio TA (*transactivation*) ([8086]) La importancia de estas regiones radica en que en el primer caso Nrf2 podría tener una actividad promotora de la transcripción independiente de los niveles redox de la célula. Y en el segundo de los casos, Nrf2 podría responder ante una situación de estrés oxidativo independientemente de Keap1, teniendo éste un efecto adicional sobre la regulación de Nrf2 en situaciones basales y en condiciones activadoras. De esta forma, la coordinación entre la respuesta independiente del estado redox y la dependiente de éste, establecerán el equilibrio entre la cantidad de Nrf2 translocado en el núcleo y el no translocado, siendo así responsable de la actividad basal del mismo y de la actividad dependiente de su activación por ROS o redox ([8086]).

Además de la regulación de la respuesta metabólica frente a una situación de estrés en la célula, Nrf2 está relacionado con la recuperación del posible tejido dañado, indicando que la respuesta de Nrf2 se produce a varios niveles. Este tipo de respuesta se debe a que Nrf2 parece estar relacionado con otras vías de señalización y procesos como la autofagia mediada por p62, la vía de señalización de NF- κ B, y la de p21/p53 [7414], aumentando la reparación

del daño en el ADN ([8165]), y la actividad proteosomal ([8166]). Así, facilita la capacidad celular de reconocer, reparar y eliminar macromoléculas y células dañadas. Por otra parte, Nrf2 también parece promover la regeneración celular del tejido dañado a través del aumento de expresión del factor de crecimiento y diferenciación celular Notch1 ([8167]).

Otros mecanismos han sido recientemente asociados a la actividad de Nrf2, como su implicación en el metabolismo de la glucosa, de lípidos, el metabolismo del hierro y los grupos hemo, en la actividad mitocondrial, en la reparación del DNA, en la autofagia, y en su propia activación y la de Keap1, entre otros (revisión Hayes y Dinkova-Kostova, 2014). Todo ello, junto con el efecto principal de este factor de transcripción en la inactivación de compuestos carcinogénicos, así como su capacidad para ser activado por algunos ECCs y compuestos de origen dietético, han hecho de él un potencial mecanismo para la quimioprevención del cáncer ([7413]).

Nrf2 y cáncer.

El efecto protector que podría tener una sobreexpresión de la maquinaria de detoxificación, principalmente de la fase II, en la carcinogénesis originada por compuestos químicos se ha estudiado desde los años 70, observándose ya un efecto protector de algunos compuestos fenólicos en modelos animales ([7414]). Posteriores estudios en ratones *knockout* han demostrado que éstos están altamente predispuestos a sufrir daño en el ADN tras una inducción química y presentan una alta susceptibilidad frente al desarrollo del cáncer en varios modelos de cáncer inducido químicamente. Además, estos modelos de ratones deficientes en Nrf2 son refractantes a la acción protectora de algunos agentes quimiopreventivos, subrayando la importancia preventiva de la vía de señalización Keap1-Nrf2-ARE ([8086]). Por otra parte, el efecto de respuesta del perfil farmacogenómico y toxicogenómico ha sido ampliamente estudiado en respuesta a agentes dietéticos quimioprotectores y tóxicos ([7392]).

A lo largo del tiempo, sin embargo, han ido apareciendo igualmente resultados contradictorios que apuntarían a un efecto negativo o perjudicial de Nrf2, y es que mutaciones, modificaciones epigenéticas y sobreexpresiones encontradas en este gen en algunos tipos celulares de cáncer podrían favorecer supervivencia y quimioresistencia de estas células a través de la activación de los genes de detoxificación. Asimismo, su efecto sobre un aumento

de la expresión de Notch1 y la inhibición de la actividad de p53 generaría una mayor proliferación y malignidad de estas células tumorales ([7414], [8168]).

Interacción entre AhR y Nrf2

La regulación coordinada entre las fases I y II del metabolismo de XMEs podría explicarse a través de la relación descrita entre AhR y Nrf2. En la región promotora de Nrf2 parecen encontrarse tanto regiones XREs como AREs. Por lo tanto, AhR podría inducir la expresión génica de Nrf2, del mismo modo que también podría hacerlo Nrf2 por sí mismo. Además, la activación de Nrf2 depende de la presencia de compuestos generadores de estrés oxidativo lo cuales pueden proceder de los metabolitos producidos por los CYPs inducidos por AhR (Figura 10). Se propone, así, una regulación coordinada de las XMEs de las fases I y II. Además, parece ser que la expresión de algunas XMEs como NQO1 podrían necesitar de una acción combinada entre AhR y Nrf2 para la activación de su expresión ([6554], [7174], [7254]).

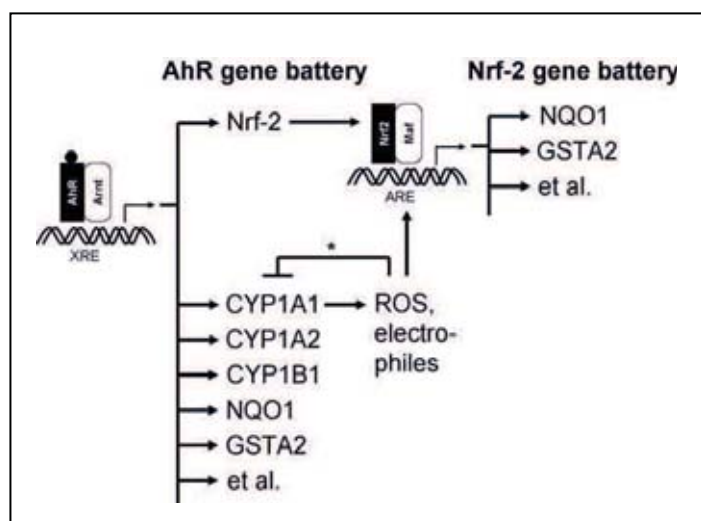


Figura 10: Activación de Nrf2 a través del efecto de AhR ([7254]).

CAR (NR1H3, *Human Gene Nomenclature Committee*):

Este factor de transcripción no requiere de la unión de ligando para su activación. Forma un heterodímero con RXR (*retinoid X receptor*) que se une preferencialmente a motivos del ADN que poseen 4 o 5 “*direct repeat elements*” (DR-4 o DR-5). CAR es conocido por activar la expresión de las XMEs CYP2B, CYP2C, CYP3A, CPR, STs, UGTs y

GSTs ([8169]), así como de los transportadores MRP2 y MRP4 (*multidrug resistance-associated protein*, MRP) ([8170]). CAR se expresa principalmente en el hígado y, en menor medida, en el intestino ([8150]). Su activación puede suceder por dos vías: mediante la activación por ligando a través de la unión directa en la región de unión a ligando del receptor, o mediante una activación indirecta, un mecanismo poco entendido hasta ahora. En ambos casos, la activación libera el receptor de su complejo de inactivación en el citoplasma y pasa a translocarse al núcleo. Posteriormente, dimeriza con RXR y activa la expresión génica. Muchos fármacos, sustancias derivadas de compuestos naturales y otros agentes xenobióticos son activadores de CAR, entre ellos el fenobarbital, como un activador indirecto, y otros ligandos propiamente dichos, como *6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b]-[1,3]thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime* (CITCO) y *1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]-benzene* (TCPOBOP) ([8171]). Debido a sus altos niveles de actividad constitutiva, ciertos ligandos de CAR se consideran “agonistas inversos” o antagonistas, con habilidad para unirse a CAR y reducir el nivel de actividad del receptor. Algunos de estos ligandos son androstanol y androstenol, metabolitos de androsterona ([8150]). La actividad de CAR se ha asociado tanto con una función protectora como facilitadora de la toxicidad de algunos compuestos químicos ([8172]). CAR también está implicado en funciones fisiológicas, como la regulación de procesos como la homeostasis de la glucosa, la lipogénesis y el metabolismo energético ([8139]).

PXR (NR1H2):

Su nombre deriva de su activación por esteroides pregnano (21-carbonos), como pregnelona 16 α -carbonitrilo (PCN), un antagonista sintético de los glucocorticoides que había sido descrito por activar la familia de hidrolasas de esteroides CYP3A ([8173]). Al igual que CAR, PXR forma heterodímeros con RXR y, tras esta unión, interacciona con regiones promotoras de respuesta a xenobióticos que consisten típicamente en motivos DR-3 o ER (*everted repeat*)-6. La familia CYP3A, regulada por este receptor, tiene su papel principal en el metabolismo de múltiples fármacos y otros xenobióticos ([8174]). Por otra parte, PXR parece ser el responsable de la regulación de la mayoría de transportadores de membrana implicados en situaciones de multiresistencia a fármacos, principalmente miembros de la familia ABC. Éstos también son transportadores de ácidos biliares y de xenobióticos en general. Entre los miembros de esta familia se encuentran los MDRs (*multidrug resistant proteins*), MRPs y OATPs (*organic anion-transporting polypeptides*) ([8139]). Tanto CAR

como PXR se expresan mayoritariamente en hígado a altos niveles y de forma similar ([8139]). Además, PXR también se expresa en intestino y en menor nivel en riñón y pulmón ([8150]). Existe una superposición de las actividades entre CAR y PXR y su especificidad a determinados ligandos, que pueden variar según la especie. También existe una superposición en cuanto a las enzimas que cada uno es capaz de activar. Así, ambos en humanos parecen capaces de activar CYP2B6 y CYP3A4. Pero al mismo tiempo presentan activación diferenciada de otros genes XMEs. Por tanto, CAR y PXR parecen funcionar de forma dinámica y paralela modulando la expresión génica en la célula según la señalización química en cada momento ([8139]). Dada su promiscuidad en la especificidad de ligando y su superposición en cuanto a sus genes diana, resulta lógico encontrar una interacción o “cross talk” entre vías de regulación de detoxificación de xenobióticos, de fármacos, metabolismo energético y de lípidos.

PPARs:

Los PPARs son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares y son similares en estructura y función a los receptores esteroideos ([8175]). Las múltiples respuestas de los PPARs están mediadas por tres subtipos expresados en diferentes tejidos y periodos del desarrollo. Los miembros de la subfamilia son: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (también llamado PPAR β , PPAR δ , NUC1 y NR1C2) y PPAR γ (NR1C3). Cada uno de ellos tiene diferentes ligandos y genes diana, y funciones fisiológicas distintas pero superpuestas.). PPAR α se expresa principalmente en hígado, corazón, riñón, intestino y en tejido adiposo marrón. PPAR β/δ está ampliamente expresado en la mayoría de tejidos en el adulto, como corazón, pulmón, testículos, músculo esquelético, hígado, bazo y timo. Dentro de ellos, el cerebro, el riñón y el intestino son los que tienen mayor expresión. PPAR γ está principalmente expresado en bazo, intestino delgado y grueso, y en adipocitos ([8139], [8150]).

En general, los PPARs activan principalmente los CYPs de la familia 4 (CYP4) y están implicados en el metabolismo de algunos xenobióticos, así como en el metabolismo energético, de lípidos y de lipoproteínas. También se han descrito efectos sobre diferenciación, proliferación celular y apoptosis, acciones anti-inflamatorias, así como un efecto contradictorio en cáncer pudiendo ser pro- y anti-carcinogénicos ([8139], [8150]). Por su parte, el principal mecanismo de acción del PPAR γ es modular la diferenciación del adipocito a través de genes implicados en adipogénesis ([8176], [8177]).

El complejo PPAR/RXR controla la expresión de genes interaccionando con los *Peroxisome Proliferator Response Elements*, PPRE de las regiones promotoras de los genes diana ([8178]). Su función depende de la activación por ligando para poder formar heterodímeros con RXR, disociarse de su co-represor, reclutar co-activadores, con actividad histona-acetil transferasa, esencial para la remodelación de histonas, y con RNA polimerasas para permitir la transcripción génica ([8179]).

Se ha descrito que algunos ácidos grasos y/o sus derivados pueden actuar como ligandos de los distintos PPARs. Entre ellos, los ácidos oleico y linoleico, prostaciclina I2 y 15-HETE (*15-Hydroxyeicosatetraenoic acid*) activan PPAR β/δ . Ácidos grasos polinsaturados y derivados de ácidos grasos como 15-deoxi-delta12,14-prostaglandina J2 (15-dPGJ2), ácido 9-hidroxi-yoctadecadienoico (HODE) y 13-HODE, entre otros, pueden activar PPAR γ , pudiendo actuar como ligandos endógenos ([8139]).

2.3. INFLUENCIA DE FACTORES DIETÉTICOS.

Muchos compuestos procedentes de la dieta presentan efectos beneficiosos para la salud, incluyendo la prevención de enfermedades neurológicas, cardiovasculares, inflamatorias, metabólicas y cancerosas ([7392], [8086]). La dieta no es solamente una fuente de posibles compuestos químicos peligrosos o perjudiciales para el organismo, como ya se ha discutido brevemente en el apartado E.1. de esta Introducción, sino que puede presentar un valor añadido al nutricional sobre la salud debido a sus componentes bioactivos, ya que se han descrito múltiples compuestos de origen dietético capaces de ejercer algunos efectos beneficiosos sobre la prevención del cáncer. Así, micronutrientes como la vitamina C y algunos carotenoides presentan capacidad antioxidante; derivados de la clorofila y las fibras vegetales pueden presentar actividad antimutagénica, y a la gran familia de compuestos fitoquímicos entre ellos compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides) y compuestos con grupos sulfuro (isotiocianatos y organosulfurados) se les han atribuido múltiples cualidades anticarcinogénicas (revisado en [6850], [7906]).

La actividad beneficiosa de muchos compuestos procedentes de la dieta no sólo radica en sus propiedades intrínsecas, sino también es su capacidad para activar la expresión de enzimas o vías de señalización protectoras ([8086], [7254], [7392]). Algunos de estos compuestos fitoquímicos tienen efecto sobre vías de señalización relacionadas con metabolismo de xenobióticos, apoptosis, ciclo celular, angiogénesis y comunicaciones

intercelulares *gap*, entre otros ([8086], [7392]). El grupo de investigación ha demostrado un efecto modulador de las dietas experimentales sobre algunos de estos mecanismos, estimulador en el caso de las dietas ricas en PUFA n-6 y generalmente protector en el de las dietas ricas en aceite de oliva ([5965], [6879], [7375]).

Dado que la carcinogénesis comprende tres estadios, iniciación, promoción y progresión, muchos compuestos potencialmente quimioprotectores pueden categorizarse ampliamente como agentes bloqueantes, impidiendo la fase de la iniciación, o agentes supresores, deteniendo o haciendo retroceder los procesos de promoción y progresión, presumiblemente afectando o perturbando factores importantes que controlan la proliferación celular, diferenciación, senescencia y apoptosis ([8050], [8086], [8180]).

En el caso de los compuestos fitoquímicos con capacidad bloqueante, su mecanismo de acción radicaría en la activación de AhR y Nrf2 principalmente, y por tanto implicados en el metabolismo de ECCs. Estos compuestos que actúan sobre AhR se pueden clasificar como inductores bifuncionales, ya que este factor de transcripción puede actuar sobre la fase I y la fase II del metabolismo de forma coordinada. Así, los inductores monofuncionales hacen referencia a activadores de Nrf2, ya que este factor sólo actúa sobre la fase II principalmente. Por otro lado, los inductores mixtos tienen capacidad de activar tanto AhR como Nrf2 ([7254]). Algunos derivados indoles presentan la capacidad de activar específicamente AhR. Los isotiocianatos han sido clasificados como activadores específicos de Nrf2, y flavonoides y ditioltionas presentan capacidad de activar ambos factores de transcripción (Tabla 1).

Además, otros múltiples compuestos dietéticos pueden afectar la expresión y regulación de las XMEs a través de la activación o inhibición de los factores de transcripción correspondientes. Entre ellos, los ácidos grasos y sus derivados pueden modular la actividad de CAR, PXR, PPARs, AhR y Nrf2, haciendo que los niveles de expresión de las XMEs puedan verse afectados por el tipo de lípidos presentes en la de dieta ([6890], [7853]).

Por otro lado, dentro de las XMEs, la familia de CYPs presenta una gran capacidad de respuesta ante diferentes factores dietéticos. Variaciones en el contenido de macronutrientes, como proteínas y lípidos, y micronutrientes, incluyendo vitaminas y minerales, pueden modificar la regulación y actividad de muchos de estos citocromos, influyendo así sobre el metabolismo de compuestos endógenos y la activación durante la fase I de compuestos

exógenos, importante durante la formación de derivados reactivos y citotóxicos ([6540], [6890]).

Tipo/Clase/Acción:	Compuesto Fitoquímico:
Agonista de AhR	Indol-3-carbanilo
	3,3'-Diindolilmetano (DIM)
	Indolo[3,2-b]carbazol
Activador de Nrf2	Sulforafano
	β -Fenetil isotiocianato (PEITC)
Activador mixto AhR/Nrf2	Quercetina
	Luteolina
	Apigenina
	Crisina

Tabla 1. Compuestos fitoquímicos activadores de AhR y/o Nrf2 ([7254]).

Asimismo, se han descrito múltiples efectos beneficiosos de los compuestos con capacidad para modular la actividad transcripcional de Nrf2-Keap1. Entre estos efectos destacan protección contra enfermedades crónicas degenerativas, cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncerosas. Algunos de estos componentes de la dieta son curcumina, ácido fumárico, usado en el procesado y conservación de alimentos, y algunos isotiocianatos de origen vegetal ([8084]).

En general, la regulación de genes pertenecientes a las fases I, II y III puede representar un efecto importante sobre la prevención de la iniciación tumoral aumentando el sistema de defensa de la célula, previniendo la activación de procarcinógenos/reactivos intermedios, y aumentando la excreción/salida de carcinógenos o metabolitos reactivos ([8086]).

Algunos autores como Austoker J ([8181]) concluyen que las modificaciones dietéticas podrían reducir la incidencia media del cáncer en dos terceras partes. Sin embargo, el problema radicaría en la propia naturaleza de la relación entre dieta y cáncer que de hecho

implica una red entremezclada de diferentes vías. El desafío consistiría en identificar aquellos factores, que individualmente o en *tandem*, pudieran resultar de utilidad como para plantear un ensayo de intervención dietética en humanos ([7905]). Del mismo modo, otros autores como Sporn and Liby ([8182]) observaron que la principal necesidad para la prevención del cáncer es el descubrimiento de nuevos agentes efectivos y seguros, y el desarrollo de nuevos paradigmas administración/dosis que puedan permitir su uso beneficioso durante largos periodos de tiempo, evitando posibles efectos secundarios indeseables. Conney AH ([8183]) sugirió que la adaptación de un régimen quimiopreventivo a un individuo o un grupo de ellos que vivan en diferentes condiciones ambientales, o con diferentes mecanismos de carcinogénesis, puede ser un aspecto importante en la prevención del cáncer en las poblaciones humanas.

El efecto potencialmente sinérgico derivado de los múltiples compuestos bioactivos procedentes de la dieta podría explicar su efecto protector frente a la carcinogénesis. Además, podría ser la combinación de diferentes compuestos junto con la activación de diversos mecanismos, la principal responsable del efecto de la dieta sobre la incidencia del cáncer observado en los estudios poblacionales. Este sería el ejemplo de la Dieta Mediterránea ([4743], [6051], [7907], [7908]).

A pesar de que la mayoría de estudios nutricionales se refieren a un efecto protector sobre la iniciación y promoción de la carcinogénesis, existen numerosos estudios cuyo objetivo sería el tratamiento del cáncer mediante compuestos fitoquímicos (fitofármacos). En general, la aplicación de compuestos derivados de la dieta presuntamente beneficiosos frente al cáncer debe realizarse teniendo en cuenta factores importantes como la dosis, la toxicidad, su metabolismo hacia pro-oxidantes o compuestos citotóxicos, interferencia con vías metabólicas endógenas, interacción con otros compuestos dietéticos y fármacos, inducción de enzimas activadoras de compuestos carcinogénicos y efectos sobre la microflora intestinal ([7392]).

3. METABOLISMO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs). EL CASO DEL 7,12-DIMETILBENZA(α)ANTRECENO (DMBA).

Los PAHs (Figura 11), resultado de la combustión incompleta de materiales orgánicos, se pueden liberar tras los diferentes tipos de quema de combustibles fósiles. En un sentido amplio, la producción de PAHs puede venir de centrales de energía, sistemas de calefacción domésticos, motores de combustión de gasolinas, incineración de residuos y actividades industriales varias. Asimismo, el tabaco proporciona una fuente localizada y directa de exposición. Cada uno de los procesos de generación de PAHs proporciona una mezcla de entre 100-300 hidrocarburos diferentes. Una estimación anual de la producción de tan sólo uno de ellos, el benzo[a]pireno (BaP), es de alrededor de 1200 toneladas, sólo en Estados Unidos ([2629]). Los PAHs son, en términos químicos, relativamente inertes. Debido a su naturaleza liposoluble tienen capacidad para acumularse en los tejidos ricos en grasas y para su eliminación necesitan ser metabolizados para aumentar su hidrosolubilidad. El problema de esta metabolización es que es la principal responsable de la formación de los compuestos reactivos carcinogénicos ([2629], [6769]).

Los PAHs se pueden subdividir en dos tipos, los de bajo peso molecular (*low molecular weight PAHs*, LPAHs) y los de alto peso molecular (*high molecular weight PAHs*, HPAHs). Los LPAHs, como por ejemplo fenantreno y pireno, contienen entre tres y cuatro anillos aromáticos, y los HPAHs, como el B(a)P, presentan entre cinco y siete anillos aromáticos. Ambos tipos son agonistas de AhR y ligandos para los CYP1s. Por su parte, los LPAHs son metabolizados hasta intermedios oxigenados reactivos (*reactive oxygenated intermediate*, ROIs) sin capacidad de interaccionar con el ADN, no forman aductos, y no son considerados compuestos mutagénicos/iniciadores de forma directa, aunque sí pueden promover la carcinogénesis. Una excepción de estos LPAH es el DMBA cuyos metabolitos sí que pueden formar aductos con el ADN. En el caso de los HPAHs, su metabolismo genera ROIs capaces de interaccionar con el ADN y, por tanto, de generar aductos estables con capacidad mutagénica, pudiendo ser estos compuestos tanto iniciadores como promotores de la carcinogénesis ([7190]).

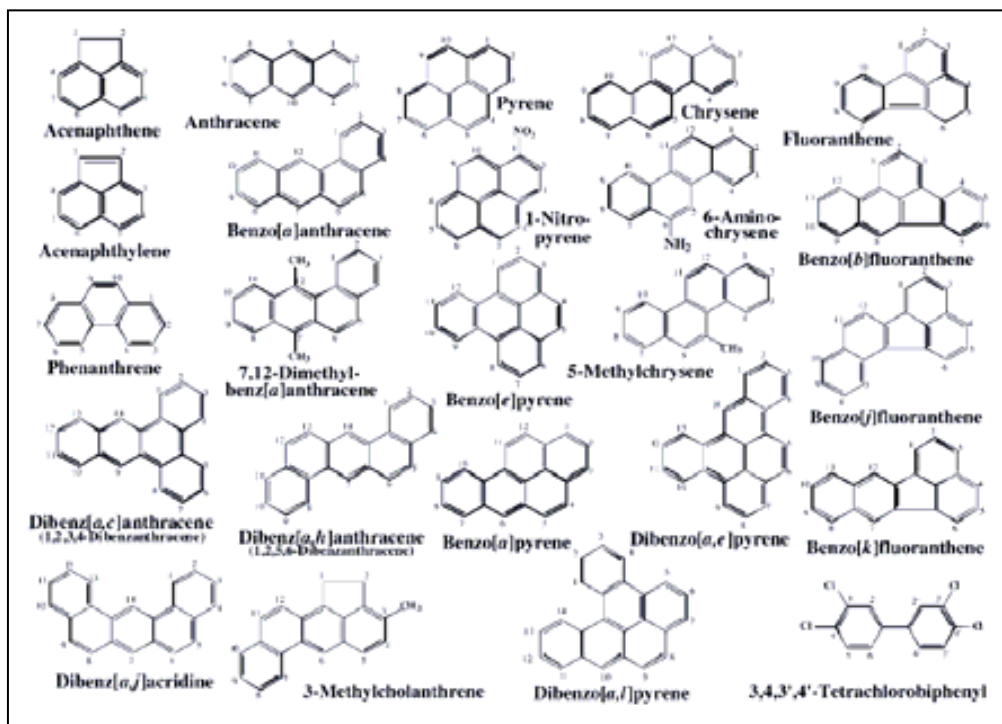


Figura 11: Algunos miembros representativos de la familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) ([2629]).

3.1. ENZIMAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL DMBA. CARACTERÍSTICAS Y EXPRESIÓN TEJIDO-ESPECÍFICA.

Las características de las principales XMEs implicadas en el metabolismo del DMBA son las siguientes:

- CYP1s:

Las principales enzimas implicadas en la fase I del metabolismo de los PAHs son los miembros de la familia CYP1, que participan tanto en la formación de diol-epóxidos como de radicales catiónicos y de o-quinonas ([6742]). En la mayoría de mamíferos, la familia 1 de los CYPs comprende tres isoformas: CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1.

CYP1A1 está implicado en la activación metabólica de muchos procarcinógenos ambientales, entre ellos los PAHs y los PHAHs. Su expresión se da principalmente en tejidos extrahepáticos como pulmón, tracto intestinal, placenta y la piel, y está presente a muy bajos niveles en el hígado. CYP1A1 es uno de las enzimas más importantes implicados en la iniciación de tumorigénesis por contaminantes ambientales ([6742], [8069]). Varios estudios

epidemiológicos demuestran que ciertas variantes genéticas del CYP1A1 en humanos están asociadas con una mayor susceptibilidad a determinados tipos de cáncer, como los de pulmón y mama ([8185], [8186]). Debido a esto, la modulación de su actividad se considera un objetivo potencial para la quimioprevención del cáncer ([8184]). Además de metabolizar PAHs, CYP1A1 también cataliza la oxidación de otros compuestos exógenos como 7-etoxiresorufina, teofillina, cafeína, 7-etoxicoumarin y clorzoxazona, y de compuestos endógenos como 17 β -estradiol (E2) y estrona ([6742]).

CYP1A2 es uno de los mayores CYPs en el hígado (13% de CYPs totales), y su expresión es constitutiva y exclusiva de este tejido. Es responsable del metabolismo de una variedad de AAs y HAAs que incluyen numerosos fármacos como fenacetina, lidocaína, tacrina y teofillina ([6742], [8069]). También es conocida la capacidad de CYP1A2 para metabolizar mediante N-oxidación, aminas aromáticas, como 2-amino-3metil-imidazo[4,5-f]quinolina (IQ) y (PhIP), bioactivándolas hasta potentes carcinógenos ([8187]). La activación de procarcinógenos por CYP1A2 también tiene importancia significativa en la susceptibilidad individual del cáncer en humanos y su inhibición también puede tener implicaciones sobre la prevención ([8184]). Por otro lado, CYP1A2 cataliza la activación de PAHs hacia compuestos reactivos con mucha menor afinidad en comparación con CYP1A1 y CYP1B1 ([6742]). CYP1A2 oxida también otros compuestos xenobióticos como acetaminofen, antipirina, cafeína, 7-etoxiresorufin, lidocaína, fenacetina, teofillina y R-warfarina ([6742]).

CYP1B1 se encuentra principalmente en tejidos extrahepáticos, de forma constitutiva principalmente en órganos relacionados con el metabolismo esteroideo aunque no exclusivamente; entre ellos, riñón, glándula mamaria, útero, ovarios, próstata, timo, glándula adrenal, bazo, pulmones, placenta, cerebro, testículos, intestino delgado, leucocitos periféricos y pituitaria ([6742], [8069]). La activación metabólica de 17 β -estradiol hasta 4-hidroxi-17 β -estradiol por CYP1B1 se ha postulado como un importante factor durante la carcinogénesis mamaria ([7208], [7215], [7396]). Al igual que los otros CYP1s, esta enzima también participa en la activación metabólica de procarcinógenos hasta compuestos carcinogénicos, generando mutagénesis y tumorogénesis ([7396], [8184]). Por lo tanto, al igual que para los otros miembros de la familia, reguladores de la expresión de CYP1B1 y su actividad han sido postulados como un importante factor durante la quimioprevención, especialmente durante los estadios tempranos de la tumorogénesis ([7849]). Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han observado que CYP1B1 parece responsable de la formación de los compuestos más reactivos

de algunos PAHs como B(a)P, DB[a,l]P y DMBA, generando con mayor estereoespecificidad los compuestos dioles en las regiones denominadas *bay* (detallado en el apartado 3.2.1 de esta Introducción) en comparación con los otros CYP1s ([6742], [8069]). CYP1B1 también cataliza la oxidación de 7-etoxiresorufin, teofillina, cafeína, 7-etoxicoumarina y bufuralol ([6742]).

La regulación de estas enzimas de la familia CYP1 está directamente relacionada con la activación de AhR por la interacción de éste con sus ligandos agonistas. CYP1A1 es de los tres el que resulta ser más dependiente de la activación de AhR, mientras que CYP1A2 y CYP1B1 en diferentes tejidos parecen presentar una expresión constitutiva relacionada posiblemente con otros factores ([6742], [8069], [8076], [8120]).

Variantes polimórficas en humanos de los distintos CYP1s, factores como la edad, el sexo, condiciones patológicas y fisiológicas y la exposición a los distintos ECCs, influyen en los datos epidemiológicos sobre el efecto de los distintos CYP1s en la susceptibilidad a distintos cáncer ([6742]).

En resumen, a pesar de que la familia CYP1 es responsable del metabolismo de una amplia variedad de compuestos endógenos y no sólo de xenobióticos, la formación de intermediarios reactivos como consecuencia de su actividad enzimática ha hecho que existan numerosos estudios dedicados al descubrimiento de compuestos inhibidores de estas enzimas en busca de efectos preventivos y terapéuticos en la lucha contra el cáncer ([8184]). El objetivo principal de esta estrategia se postuló como: 1) Evitar la conversión de compuestos exógenos procarcinogénicos hasta carcinógenos activos. 2) Prevenir la conversión de precursores hormonales hasta derivados hormonales carcinogénicos 3) Impedir la inactivación de fármacos utilizados durante el tratamiento del cáncer ([8188]).

- NQO1:

También se conoce como *Nicotinamide quinone oxidoreductase*, *DT-diaphorase*, *Quinone reductase type 1* y/o *Menadione reductase* ([6640]). Es una flavoproteína dependiente de FAD ampliamente distribuida en todos los tejidos. Cataliza la reducción de quinonas, quinona-iminas, compuestos nitroaromáticos y colorantes azoicos. Esta reacción consiste en la reducción de dos electrones, dependiente de NADPH o NADH, generando compuestos hidroquinona con menor capacidad reactiva que las quinonas. Estos grupos quinona pueden a su vez sufrir glucuronización y/o sulfatación para facilitar su eliminación. Su expresión está regulada tanto por Nrf2 como por AhR, desempeñando un papel importante

en el sistema de protección celular frente a agentes xenobióticos y otros factores relacionados con el estrés oxidativo ([7344]). Debido a ésta y otras características, algunos autores discuten sobre su apropiada clasificación dentro de las enzimas de fase I o de fase II ([6640]).

Al parecer, NQO1 podría ayudar en el mantenimiento de ciertos antioxidantes endógenos, como son ubiquinona (Co-enzima Q) y α -tocoferol (vitamina E) quinona, en su forma reducida y por tanto activa, contribuyendo al mantenimiento del estado redox de la célula ([8189], [8190]). Otra de las importantes posibles acciones de esta enzima, más allá del metabolismo de xenobióticos, está relacionada con su capacidad de estabilizar la proteína p53 evitando su degradación y aumentando su efecto sobre la parada de ciclo celular y la activación de la apoptosis como consecuencia de una situación de estrés ([6640], [7345]).

Algunos polimorfismos de NQO1 en humanos, como NQO1*2 que produce una proteína con una vida media menor que el fenotipo *wild type*, han sido asociados con susceptibilidad a algunos tipos de cáncer como el de pulmón ([6742]). De igual modo, NQO1 ha sido relacionado con un mayor riesgo de sufrir algunos tipos de cáncer como leucemia, colon, cutáneos, faríngeos y gástricos, entre otros ([6640]).

En determinadas circunstancias se ha encontrado que el metabolismo asociado a NQO1 puede generar especies reactivas de oxígeno o contribuir a la generación de especies alquilantes ([7190]). Por tanto, NQO1 podría ejercer tanto efectos beneficiosos como perjudiciales.

- GSTs:

En mamíferos existen tres familias separadas según su localización: citosólicas, microsomales y mitocondriales. Éstas presentan distinta estructura y origen evolutivo ([7412], [8028]). La mayoría de las GSTs microsomales están implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico y se denominan comúnmente como *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism* (MAPEG). Las GSTs mitocondriales son clasificadas dentro de la familia *kappa*, GSTKs, y parecen estar involucradas en la multimerización de la adiponectina ([7412]). En cuanto a la familia de las GSTs citosólicas se expresan de forma constitutiva en múltiples tejidos y constan de varios polimorfismos dentro de esta familia: GSTA (*alpha*), GSTM (*mu*), GSTP (*pi*), GSTS (*sigma*), GSTT (*theta*), GSTZ (*zeta*) y GSTO (*omega*). Tienen un papel importante en la metabolización de compuestos tóxicos y carcinogénicos, y están fuertemente implicadas en el mantenimiento del estado redox de la

célula ([8028], [8034]). Su actividad enzimática se basa en la conjugación con glutatión de los compuestos reactivos de forma que disminuyen su efecto perjudicial, aumentan su hidrosolubilidad y facilitan su excreción. Catalizan el ataque nucleofílico de GSH a compuestos apolares que contienen un átomo de carbono, de nitrógeno o de azufre electrofílico, incluyendo sustratos como nitrobenenos halogenados, compuestos carbonilos insaturados, quinonas e hidrocarburos aromáticos oxidados inestables, entre ellos derivados epóxidos y diolepóxidos de los PAHs ([8028]). La mayoría de conjugados con glutatión son menos tóxicos y más polares y pueden ser excretados del organismo. Existen múltiples estudios sobre la inducción de las distintas GSTs por parte de compuestos exógenos, desde compuestos carcinogénicos como PAH hasta antioxidantes fenólicos y otros agentes quimiopreventivos a través de la activación de los factores de transcripción CAR, AhR, Nrf2 y/o PPAR γ ([7412]). Algunos polimorfismos de las GSTM1, GSTP1 y GSTT1 han sido relacionados con susceptibilidad a ciertos tipos de cáncer, entre ellos el de mama y próstata ([6742]). Del mismo modo, algunos estudios han relacionada la ausencia de GSTP1 con el aumento de la carcinogénesis en el modelo experimental de cáncer de piel en ratón ([6545]).

- UGTs:

Las enzimas de la familia UGT predominantemente catalizan reacciones de glucuronización, en las que se realiza la unión covalente de ácido glucurónico, derivado del cofactor UDP-ácido glucurónico, con determinados grupos funcionales. Numerosos nucleófilos pueden servir como grupo receptor para la unión con glucurónico, entre ellos se encuentran alcoholes alifáticos, fenoles, ácidos carboxílicos, aminas aromáticas y alifáticas, tioles y carbonos ácidos ([8033]). Esta reacción de glucuronidación sirve como vía de eliminación de numerosos compuestos tanto endógenos como exógenos con diversas estructuras. Además esta reacción está implicada en el metabolismo de compuestos endógenos como bilirrubina, ácidos biliares, ácidos grasos, hormonas esteroideas, hormonas tiroideas y vitaminas liposolubles. El principal órgano donde se expresan las UGTs es el hígado, seguido de riñón y tracto gastrointestinal. Algunas enzimas como UGT1A y UGT2B pueden estar diferencialmente expresados en otros tejidos como pulmón, epitelios, ovario, testículo, glándula mamaria y próstata ([8033], [8191]). Las UGTs son una superfamilia de enzimas con diferentes isoformas capaces de metabolizar diferentes sustratos. En humanos se han identificado hasta la fecha 22 isoformas divididas en 4 familias (UGT1, UGT2, UGT3 y UGT8) siendo las más importantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos las UGT1

y UGT2. Todos los UGTs son proteínas trans-membrana localizadas en el retículo endoplasmático y en el compartimento nuclear. Diferentes factores de transcripción están implicados en la expresión de los diferentes UGTs en cada tejido, entre ellos PXR, FXR, LXR, PPAR α , AhR y Nrf2 ([8033], [8191]). La glucuronidación es una de las principales vías de detoxificación de muchos carcinógenos, entre ellos PAHs, AAs y HAAs. Poco se conoce hasta la fecha sobre polimorfismos en las UGTs que puedan relacionarse con susceptibilidad al cáncer en humanos ([6742]).

- **STs (o SULTs):**

Las enzimas STs catalizan la transferencia de un grupo sulfonato (SO_3^-) desde un donador universal de sulfatos, el 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), hasta grupos hidroxilo o amino como aceptores. Estas enzimas pueden metabolizar compuestos xenobióticos y compuestos endógenos como ácidos biliares, hormonas tiroideas y esteroideas. Su expresión está altamente influenciada por la exposición a xenobióticos y regulada por PXR y CAR ([8192]). Las STs citoplasmáticos catalizan la sulfonación de muchos carcinógenos, entre ellos los PAHs. La sulfonación es generalmente considerada un proceso de detoxificación aunque en algunos casos, como en el DMBA, puede generar la formación de esteres de sulfato altamente reactivos con capacidad de unirse al ADN. Las STs en humanos constan de tres familias, SULT1, SULT2 y SULT4, que a su vez constan de 13 miembros ([6742], [8192]).

- **EHS:**

La Epóxido Hidrolasa es una enzima microsomal que cataliza la hidrólisis de varios tipos de compuestos oxidados, tanto endobioticos como xenobioticos, hasta dihidrodioles, menos reactivos y más polares. Pero en colaboración con los CYP1s es responsable de la formación de los altamente reactivos diol-epóxidos de los PAHs ([6742]). La EH parece estar implicada en la hidrólisis de epóxidos de ácidos grasos, lo que podría ser su función endógena. Esta actividad sobre derivados del ácido araquidónico le confiere una función sobre inflamación e hipertensión. La expresión y actividad de EH es mayor en hígado y riñón, aunque también está implicado en importantes procesos fisiológicos en cerebro, pulmón y otros órganos. En mamíferos forma un homodímero. En el dominio N-terminal presenta actividad fosfatasa que hidroliza fosfolípidos y en el dominio C-terminal presenta actividad epóxido hidrolasa convirtiendo epóxidos a dioles. La regulación de la expresión de EH parece

estar relacionada con la activación de PPAR γ ([8193]). En resumen, la inducción de EH y su actividad hidrolasa de epóxidos alifáticos y alquenos producidos por CYPs hacia dihidrodioles puede desempeñar un doble papel detoxificando o bioactivando PAHs y otros xenobióticos dependiendo de la naturaleza del sustrato ([7190]).

3.2. FORMACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DEL DMBA E INTERACCIÓN CON EL ADN (ADUCTOS DMBA-ADN).

Actualmente se conocen tres vías principales de metabolismo de fase I o activación de los PAHs y, en concreto, del DMBA ([6769]).

1. Formación de diol-epóxidos.

La primera vía descrita está considerada como el mecanismo dominante de metabolización del DMBA. Tiene lugar principalmente en la región *bay* de la molécula, a partir de la cual se generan los metabolitos más reactivos, siendo éstos los más estudiados ([1425], [2629], [8194]). Esta vía implica la participación de tres reacciones enzimáticas principales. Una primera oxidación de un doble enlace, catalizada por la familia de los CYP1s, da lugar a la formación de un grupo epóxido, complejo oxidado inestable. Seguidamente, la hidrólisis de este grupo oxidado es catalizada por la enzima EH dando lugar a un grupo dihidrodiol, en su mayoría de naturaleza *trans*. Finalmente, de nuevo las enzimas CYP1s catalizan la oxidación del doble enlace adyacente al ya oxidado, dando lugar a un grupo epóxido junto al dihidrodiol anteriormente formado, generándose así el diol-epóxido ([1425], [2629]). Los PAHs pueden contener en su estructura una región denominada *bay* o en algunos casos una región llamada *ffjord* (Figura 12). Estas son zonas de la molécula donde los anillos aromáticos se encuentran más próximos y se genera una región de mayor impedimento estérico. Los diol epóxidos de las regiones *bay* o *ffjord* son electrófilos con una gran capacidad de interactuar con el ADN mientras que algunos de los isómeros diol-epóxidos formados en regiones no *bay* o *ffjord*, tienen una menor capacidad mutagénica y/o carcinogénica ([2388], [2629], [6769], [7701]). A partir de microsomas hepáticos de rata, diversos estudios han determinado que para la mayoría de PAHs su metabolismo da lugar a la formación de diol-epóxidos en la región *bay* principalmente. En concreto, representan entre el 60-90% en comparación con el resto de posibles metabolitos formados ([2629], [6769], [7701]). Una complejidad añadida al metabolismo de los PAHs es que la mayoría de los enlaces aromáticos son quirales. La formación de los distintos compuestos estereoisómeros de la misma molécula depende de la estereoespecificidad de las enzimas. De

manera que distintas isoenzimas presentan diferente especificidad, generando mayoritariamente unos estereoisómeros en comparación con los otros posibles. Durante el metabolismo se forma un grupo racémico con los distintos estereoisómeros en diferentes proporciones, dentro de los cuales algunos serán más reactivos que otros. La mezcla racémica de los estereoisómeros diol-epóxidos será diferente dependiendo de la proporción de las distintas isoformas de los CYP1s, lo que puede variar entre tejidos, entre individuos y entre especies ([6769], [7395], [7991]).

Dentro de los estereoisómeros de los diol-epóxidos de la región *bay* de la mayoría de PAHs, se ha descrito que los isómeros R,S,S,R presentan una mayor capacidad para unirse al ADN y formar aductos que el resto. Además, se ha observado que algunos de los PAHs de 4 anillos aromáticos, como el caso del DMBA, tienen una mayor capacidad de unirse al ADN que los que contienen cinco anillos ([6769]).

Para los diol-epóxidos de los PAHs de la región *bay*, la mayoría de aductos han sido descritos como resultado de la unión entre el carbono bencílico del epóxido (en el caso del DMBA-diol-epóxido, el carbono con la posición 1) con el grupo amino exocíclico de la desoxi-guanosina (dGuo) o de la desoxi-adenosina (dAdo), las bases púricas unidas a desoxirribosa dentro de la cadena de ADN ([8194]). Otros aductos minoritarios se han encontrado unidos a desoxi-citidina, también al N-7 de la dGuo y a la desoxi-citosina (dCyd) ([8195]).

De los diol-epóxidos derivados de PAHs, los de estructura plana presentan una mayor formación de aductos con los residuos dGuo, mientras que los que proceden de PAHs no planos presentan mayor afinidad por los dAdo. En el caso del DMBA diol-epóxido, éste presenta una formación de aductos similar entre residuos dGuo y dAdo. La configuración de los aductos entre los diol-epóxidos y los residuos purínicos del ADN puede ser tanto *cis* como *trans*, con una preferencia general hacia la formación de aductos *trans* ([6769]).

En el caso de la estereoisomería del DMBA se pueden formar cuatro enantiómeros de los diol-epóxidos de la región *bay*: 3S,4R,1R,2S-DMBA-diol-epóxido; 3R,4S,1S,2R-DMBA-diol-epóxido; 3S,4R,1S,2R-DMBA-diol-epóxido y 3R,4S,1R,2S-DMBA-diol-epóxido. Esta nomenclatura está relacionada con la capacidad de cada carbono sustituido del anillo para desviar la luz polarizada. A su vez, estos cuatro compuestos se pueden clasificar en dos diastereoisómeros dependiendo de la disposición espacial de los grupos sustituyentes. De esta forma se pueden clasificar como: *anti*-7,12-dimetilbenz[α]antraceno-3,4-diol-1,2-epóxido (3S,4R,1R,2S-DMBA-diol-epóxido y 3R,4S,1S,2R-DMBA-diol-epóxido) y *sin*-7,12-

dimetilbenz[α]antraceno-3,4-diol-1,2-epóxido (3S,4R,1S,2R-DMBA-diol-epóxido y 3R,4S,1R,2S-DMBA-diol-epóxido), ambos con capacidad iniciadora. En el modelo murino de cáncer de piel inducido con DMBA estos metabolitos generan principalmente tres tipos de complejos estables con el ADN, mayoritariamente con desoxiadenosina y desoxiguanosina: *anti*-DMBADE-dGuo, *sin*-DMBADE-dAdo, y *anti*-DMBADE-dAdo ([4048]). En el caso de células en cultivo embrionarias de Hamster, el mayor número de aductos producidos por los diol-epóxidos del DMBA corresponden a *syn*-(4S,3R,2S,1R)-DMBA-dAdo (34%), *anti*-(4R,3S,2S,1R)-DMBA-dGuo (20%) y *anti*-(4R,3S,2S,1R)-DMBA-dGuo (16%). Por otro lado, en células de carcinoma humano MCF-7, el mayor número de aductos se ha descrito que corresponden a la interacción de (4R,3S,2S,1R)-DMBA-diol-epóxidos con el ADN ([7395]).

La elevada reactividad de los compuestos diol-epóxido de los PAHs hace que su determinación o detección sea altamente complicada, ya que son muy difíciles de aislar a partir del sistema de activación metabólica en el organismo. Rápidamente interaccionan con otras moléculas o se hidrolizan ([6769]). A pesar de que los diol-epóxidos y otros compuestos poco estables son difícilmente observables en la mayoría de situaciones metabólicas *in vivo* e *in vitro*, algunos compuestos intermedios de las diversas reacciones pueden servir para medir la evolución del proceso. En el caso del DMBA, diversos metabolitos han podido ser detectados por varios autores a partir del metabolismo de microsomas o de perfusiones hepáticas de rata. Entre ellos, los principales son: los dihidrodioles (DMBA-3,4-dihidrodiol; DMBA-8,9-dihidrodiol; DMBA-5,6-dihidrodiol y DMBA-10,11-dihidrodiol); los hidroxilados de los metilos de la posición 7 y 12 (7-OHM-12-MBA, 12-OHM-7-MBA y 7,12-diOHMBA); compuestos mono-hidroxilados en diferentes posiciones (como 2-OH-DMBA, 3-OH-DMBA, 4-OH-DMBA); además de las múltiples combinaciones, entre las cuales se hallan: 4-OH-7-OHM-12-MBA, 3-OH-7-OHM-12MBA, 3-OH-7,12-diOHMBA, 7-OHM-12-MBA-10,11-dihidrodiol, 7-OHM-12-MBA-5,6-dihidrodiol, 7-OHM-12-MBA-8,9-dihidrodiol, 7-OHM-12-MBA-3,4-dihidrodiol, 7-M-12-OHMBA-5,6-dihidrodiol, 7,12-diOHMBA-8,9-dihidrodiol. Todos ellos son metabolitos intermedios con diferente capacidad carcinogénica ([7449]; [7701]; [7989]).

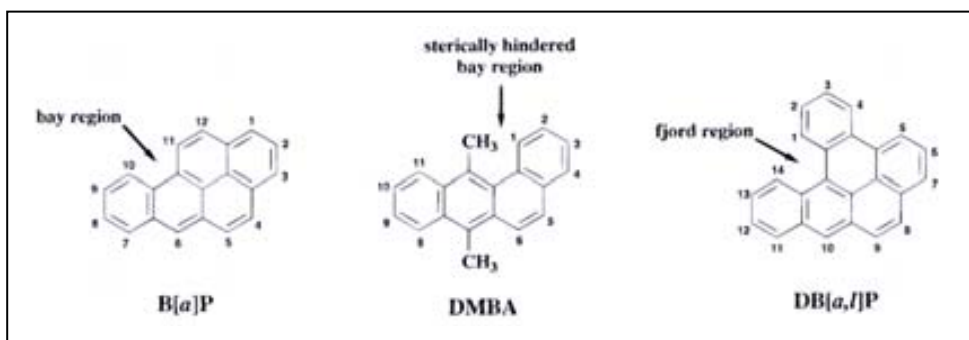


Figura 12: Tipos de regiones bay y fjord que se pueden encontrar en los diferentes PAHs ([8196]).

2. Formación de radicales catiónicos.

Los radicales catiónicos de los PAHs se forman a través de la pérdida de un electrón mediante una oxidación electrónica. Los radicales catiónicos son electrofilicos con capacidad para interactuar con centros nucleofílicos de macromoléculas celulares. Esta oxidación de los PAHs puede ser catalizada por CYPs y otras enzimas con capacidad peroxidasa, como la *Horseradish peroxidase* (HRP) ([4177]). La probabilidad de una molécula de PAH para perder un electrón está relacionada con varios factores, entre ellos los bajos niveles de potencial de ionización (*Ionization potencial*, IP). Se considera que los valores de IP por encima de 7.35eV para un PAH no se podrían relacionar con una activación y un efecto mutagénico a través de radicales catiónicos ([4177]). En el caso del DMBA, su IP es de 7.22eV, por lo que está dentro del rango de los posibles PAHs que pueden ser metabolizados por esta vía ([6769]). A demás de los valores de IP, otro factor a tener en cuenta es la localización de la carga en un lugar favorable para la interacción con otras moléculas y una configuración geométrica que facilite la unión covalente con centros nucleofílicos. Puede existir una regioselectividad para la localización de la carga positiva dentro de la molécula. En el caso del radical catiónico del DMBA esta carga puede localizarse predominantemente en las posiciones de los carbonos 7 o 12, formándose dos posibles grupos metilo electrofilicos con capacidad de interactuar con centros nucleofílicos ([6769]).

Los radicales catiónicos son altamente reactivos e inestables por lo que son difíciles de aislar para identificarlos. Estos radicales rápidamente forman aductos, que en el caso de los del ADN son inestables y producen depurinizaciones espontáneas ([4177]). La interacción entre los radicales catiónicos y el ADN se produce a través de una unión principalmente con las

posiciones N7 de las bases de guanina y/o las N3 de las adeninas, tras lo cual los enlaces glicosídicos con la desoxiribosa son debilitados y se rompen, liberándose el complejo PAH-base púrica y generando un sitio apurínico en el ADN, que puede derivar en la generación de mutaciones ([4177], [6769]). A través de varios estudios *in vitro* se han identificado las siguientes interacciones de los radicales catiónicos del DMBA con las bases de guanina (Gua) y adenina (Ade): 7-MBA-12-CH₂-N7-Gua (el mayoritario), 12-MBA-7-CH₂-N7-Gua, 7-MBA-12-CH₂-C8-dGuo, 7-MBA-12-CH₂-C8-Gua, 7-MBA-12-CH₂-N7-Ade y 12-MBA-7-CH₂-N3-Ade ([4176]). En otros estudios los principales aductos encontrados fueron 7-MBA-12-CH₂-N7-Ade (80%) y 7-MBA-12-CH₂-N7-Gua (20%) ([4175]). A pesar de que esta vía de activación podría tener importancia durante el metabolismo *in vitro*, y la formación de los metabolitos del DMBA, otros resultados *in vivo* parecen restarle importancia y los aductos formados por radicales catiónicos representarían un pequeño porcentaje ([6769]).

3. Formación de O-quinonas.

Partiendo de los dihidrodioles formados por los CYP1s durante una primera etapa común a la vía de formación de diol-epóxidos, mayoritariamente de naturaleza *trans* y próximos a la región *bay*, éstos pueden sufrir una oxidación por las enzimas pertenecientes a la familia de las AKRs (*Aldo-keto reductases*), una superfamilia de oxidoreductasas citosólicas dependientes de NADPH. De esta forma, los dioles se oxidan hasta cetonas. Tras esta primera oxidación enzimática, de forma espontánea, el grupo cetona se reorganiza hasta catecol, que es poco estable y sufre una autooxidación hasta formar una o-quinona. Los PAHs o-quinonas son electrofílicos y altamente reactivos con compuestos endógenos nucleofílicos. De esta manera, pueden formar conjugados con glutatión favoreciendo su eliminación, o con el ADN dando lugar a aductos que pueden ser tanto estables como depurinizantes ([6769], [8197]). Además, los PAHs o-quinonas pueden sufrir una reducción tanto enzimática, por parte de los AKR, como no enzimática, para volver a formar el catecol original a través de una reacción dependiente de NADPH. Este proceso da lugar a un ciclo redox que amplifica la formación de ROS, con capacidad para causar daño en el ADN mediante la formación de 8-oxo-dGuo, una lesión que contribuye a la formación de mutaciones en el ADN por conversiones G→T ([8197]).

En los últimos años se ha propuesto una cuarta vía metabólica que afectaría a algunos PAHs que contienen en su estructura grupos metilo, como es el caso del DMBA. Estos grupos metilo sufrirían una oxidación enzimática por parte de los CYP1s para formar un hidroximetilo

el cual podría ser esterificado por la Sulfotransferasa dando lugar a la formación de un ester sulfúrico altamente reactivo ([6769]).

En resumen, todas estas vías podrían contribuir a la carcinogénesis inducida por PAHs. Actualmente, la vía de los diol-epóxido sigue considerándose la principal vía de acción del DMBA. Sin embargo, éste es un tema controvertido para muchos autores, ya que se ha sugerido que son los sitios apurínicos, causados principalmente por los aductos inestables, los que inducen las transversiones típicamente producidas por el DMBA y otros PAHs, ([4048], [4080], [4175], [4176], [4177]). Varios trabajos han presentado resultados contradictorios sobre la formación de los diversos tipos de aductos y las mutaciones en regiones de genes específicos, como los codones 12, 13 y 61 del oncogén H-ras en el modelo de ratón de cáncer epitelial. Aún existe el debate sobre la mayor importancia de los aductos apurinizantes o los aductos estables ([4048], [8198]).

Estudios específicos en el modelo de rata cáncer de mama inducido por DMBA han determinado que la formación de aductos en la glándula mamaria de la rata parece presentar una proporción del 52% de aductos depurinizantes formados por la oxidación de un electrón del DMBA. Los aductos principalmente encontrados en este caso fueron 7-MBA-12CH₂-N7Ade (39%), mientras que el 7-MBA-12CH₂-N7Gua fue solo del 13%. Por otro lado, los aductos estables correspondieron al 48% de los aductos formados en este tejido, los cuales proceden prácticamente en su totalidad de la interacción de los diol-epóxidos de la región bay (3,4-diol-1,2-epóxido-DMBA) con el ADN. Estos estudios fueron realizados mediante administraciones por punción directa en la glándula mamaria ([8199]).

Se ha descrito que el tipo de administración del DMBA u otros PAHs, la dosis, el tiempo de exposición, las enzimas y tejidos implicados en su metabolismo, así como el tejido diana estudiado, varían el tipo de aductos mayoritariamente formados ([6769]).

De forma general para todos los PAHs, y en el caso concreto del DMBA, el metabolismo específico por parte de las enzimas de fase II ha sido poco estudiado. Además, debido a la gran cantidad de compuestos diferentes producidos durante la fase I, el número de compuestos derivados formados por las múltiples enzimas pertenecientes a la fase II aumenta de forma exponencial incrementando con ello la complejidad de este proceso (Figura 13).

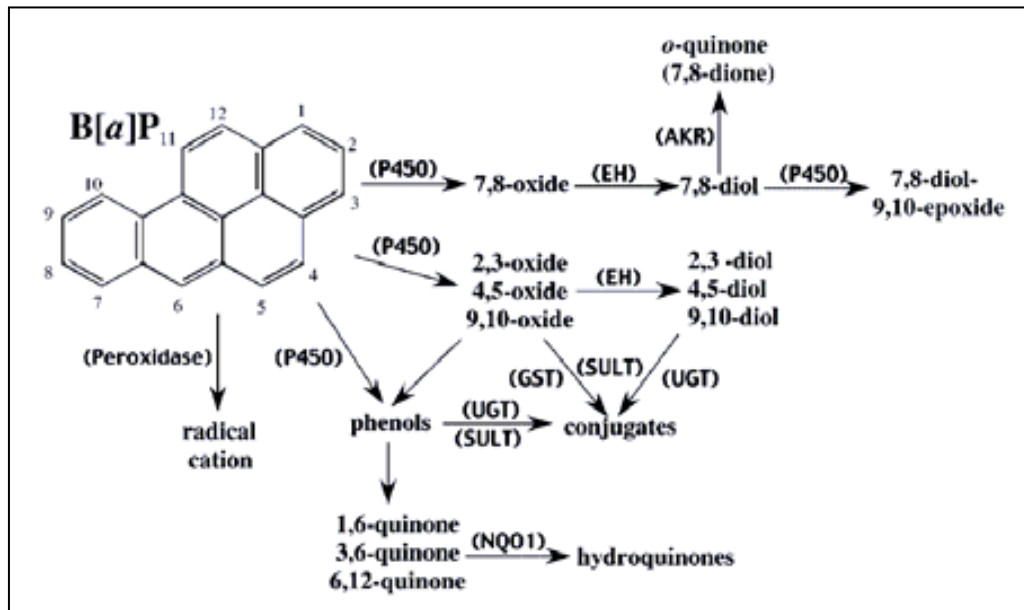


Figura 13: Principales vías de metabolización de los PAHs. Ejemplo del B(a)P ([6742]).

3.3 REPARACIÓN DE LOS ADUCTOS DMBA-ADN.

A pesar de que en este trabajo la reparación de los aductos formados en el ADN no ha sido motivo de estudio, ésta constituye un aspecto fundamental durante el inicio de la carcinogénesis experimental y representa un objetivo que el grupo de investigación pretende afrontar en un futuro próximo. Por todo ello, en esta Introducción se describirán brevemente algunas de las características de este proceso.

Los compuesto carcinogénicos exógenos pueden generar una amplia variedad de daño en el ADN, desde pequeños aductos, lesiones de interacción entre las dos cadenas hasta roturas de la doble cadena (*double strand breaks*, DSBs). Una de las principales características de los ECCs que los distingue de los carcinógenos endógenos es su habilidad para formar aductos estables e irreversibles, por ejemplo mediante uniones covalentes con macromoléculas ([7190]).

En respuesta a un estrés genómico debido a una inducción química se activa una respuesta celular compleja que incluye la respuesta de proteínas quinasa y factores de transcripción como el supresor tumoral p53, el *cyclin-dependent kinase inhibitor* p21 y la familia de proteínas Bcl-2, que median la parada de ciclo celular en G1 en puntos de chequeo

determinados, la reparación de lesiones en el ADN o el inicio de apoptosis ([6931], [6932], [7190]).

Los aductos químicos producidos por el DMBA son, de forma general, de dos tipos, estables o tipo *bulky*, así como los sitiosapurínicos. En ambos casos, debido a que obstruyen la transcripción y replicación del ADN, activan los sistemas de reparación tipo *nucleotide excision repair system* (NER) y *mismatch repair system* (MMR), capaces de reconocer y reparar distorsiones en la estructura del ADN durante la replicación (Figura 14). En todos los casos son daños en una sola de las cadenas, por lo tanto la cadena complementaria se usa como molde para realizar la sustitución de la base dañada ([6931], [7190]) En la figura X se puede observar el mecanismo de reparación de ambos sistemas y las principales proteínas implicadas ([8200], [8201]). Además, otros tipos de reparación están implicados en otros daños en el ADN posiblemente derivados tras la exposición al DMBA, como daños debidos al estrés oxidativo, reparado principalmente por el sistema *base excision repair* (BER), o daños de rotura de doble cadena generalmente reparados por los sistemas *homologous recombinant repair* (HRR) y *non-homologous end-joining* (NHEJ) ([6931]). Problemas en la detección del daño en el ADN, en la reparación, así como errores producidos durante esta, y en la inadecuada inducción de la apoptosis, forman parte del proceso de iniciación, promoción y progresión tumorales. Algunas proteínas importantes implicadas en la detección del daño son ATM, ATR, BRCA1, DNA-PK y PARP, entre otras ([6931], [6934], [7190]).

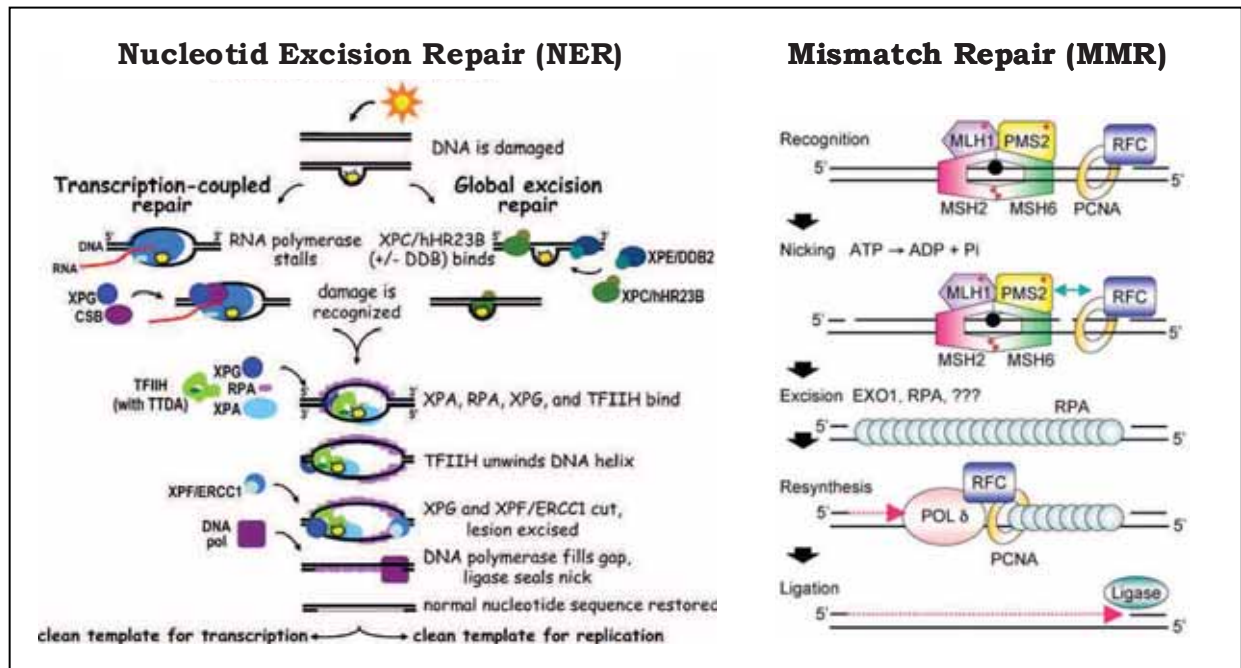


Figura 14: Principales sistemas de reparación de los aductos producidos por el DMBA (Modificado de [8200], [8201]). CSB: *Cokayne syndrome B*, DDB2: *DNA damage-binding protein 2*, ERCC1: *Excision repair cross-complementation 1*, EXO1: *Exonuclease 1*, hHR23B: *human homologue of the yeast protein RAD23 B*, MLH1: *mutL homolog 1*, MSH2: *DNA mismatch repair protein 2*, MSH6: *DNA mismatch repair protein 2*, PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen A*, PMS2: *Mismatch repair endonuclease 2*, POLδ: *DNA polymerase δ*, RFC: *replication factor C*, RPA: *Replication Protein A*, TFIIH: *Transcription factor II Human*, TTDA: *Trichothiodystrophy A*, XPA: *Xeroderma Pigmentosum A*, XPC: *Xeroderma Pigmentosum C*, XPE: *Xeroderma Pigmentosum E*, XPF: *Xeroderma Pigmentosum F*, XPG: *Xeroderma Pigmentosum G*.

F. OBJETIVOS.

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación que desarrolla el “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” sobre “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama”. La investigación se ha realizado utilizando como soporte experimental el modelo de cáncer de mama inducido en la rata hembra Sprague-Dawley con el hidrocarburo aromático policíclico DMBA y se han evaluado los efectos de dos dietas ricas en aceite de semillas (aceite de maíz) o aceite de oliva virgen, en comparación con una dieta normolipídica control.

Los objetivos son los siguientes:

1. Estudiar la ontogenia de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos (XMEs) en hígado y glándula mamaria, así como el efecto que los lípidos de la dieta pueden ejercer sobre ésta, con el fin de identificar las ventanas de vulnerabilidad relacionadas con la edad y el tipo de dieta (Serie experimental 1).

1.1. Caracterizar y comparar el perfil de expresión de ARNm y proteína de las enzimas de fase I CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, y de las enzimas de fase II NQO1 y GSTP1, en hígado y glándula mamaria.

1.2. Determinar los cambios que se producen en la expresión hepática de dichas XMEs a lo largo del tiempo, el papel de los factores de transcripción AhR y Nrf2 en los cambios producidos a nivel de ARNm, así como el efecto modulador de los lípidos de la dieta.

1.3. Determinar los cambios que se producen en la expresión en glándula mamaria de dichas XMEs a lo largo del tiempo, el papel de los factores de transcripción AhR y Nrf2 en los cambios producidos a nivel de ARNm, así como el efecto modulador de los lípidos de la dieta.

2. Estudiar la influencia de los lípidos de la dieta en la expresión de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos, en hígado y glándula

mamaria a distintas edades, como mecanismo de la acción moduladora de dichos lípidos en la iniciación de la carcinogénesis mamaria experimental (Serie experimental 1).

2.1. Analizar la expresión hepática de ARNm y proteína de las XMEs en los diferentes grupos experimentales y evaluar el papel de los factores de transcripción AhR y Nrf2 en la modulación de dicha expresión por los lípidos de la dieta.

2.2. Analizar la expresión en glándula mamaria de ARNm y proteína de las XMEs en los diferentes grupos experimentales y evaluar el papel de los factores de transcripción AhR y Nrf2 en la modulación de dicha expresión por los lípidos de la dieta.

3. Profundizar en el estudio de la influencia de los lípidos de la dieta en el metabolismo de xenobióticos en los periodos inmediatamente posteriores a la exposición a éstos, a través del análisis de la expresión y actividad de las XMEs, la formación de metabolitos reactivos del DMBA en hígado y la de aductos premutagénicos DMBA-ADN en tejido diana (Serie experimental 2).

3.1. Determinar el efecto modulador de los lípidos de la dieta en la expresión y la actividad de las XMEs de fase I CYP1A1 y CYP1B1.

3.2. Determinar el efecto modulador de los lípidos de la dieta en la expresión y la actividad de las XMEs de fase II NQO1 y GSTP1.

3.3. Investigar si los efectos de los lípidos de la dieta en la expresión de las XMEs de fase I y fase II se ejercen a través de los factores de transcripción AhR y Nrf2, respectivamente.

3.4. Cuantificar los niveles plasmáticos de los metabolitos activos del DMBA formados como consecuencia de la acción de los enzimas de fase I en las horas siguientes a la administración del carcinógeno en los diferentes grupos experimentales.

3.5. Determinar los aductos DMBA-ADN formados en glándula mamaria tras la inducción carcinogénica como consecuencia de la formación de metabolitos activos en los diferentes grupos experimentales.

4. Evaluar los efectos moduladores diferenciales de las dietas ricas en aceite de maíz y aceite de oliva virgen en la iniciación de la carcinogénesis mamaria experimental a través del estudio de los parámetros clínicos de la carcinogénesis (tiempo de latencia, incidencia, contenido y volumen tumorales) (Serie experimental 2).

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

OBJETIVOS



MATERIALES & MÉTODOS

A. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

Este trabajo se soporta experimentalmente en el modelo de cáncer de mama inducido en la rata *Sprague-Dawley* mediante el carcinógeno químico 7,12-dimetilbenz(α)antraceno (DMBA). Los diseños de las dos series experimentales se realizaron con el objetivo de analizar los efectos de las dietas con alto contenido en MUFA n-9 o PUFA n-6 sobre las etapas de la carcinogénesis mamaria, especialmente sobre la iniciación. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (CEEAH 566/3616 y CEAAH 987r).

1. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES.

El estudio se realizó con ratas hembra *Sprague Dawley* (*Charles River Lab.*; cepa Crl:OFA(SD), *L'Arbresle Cedex*, Francia). Al inicio del ensayo los animales tenían 23 días de edad (d.e.) en la serie experimental 1 y 22 ó 23 días de edad en la serie experimental 2. Su peso corporal medio era de 50.9 g para la serie experimental 1 y de 47.5 g para la serie experimental 2. En este momento los animales fueron destetados y alimentados *ad libitum* con agua corriente y la correspondiente dieta experimental. Los animales se mantuvieron en un estabulario convencional con condiciones de barrera, filtración de aire y presión positiva. Permanecieron a una temperatura de $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, al 50% de humedad y con un ritmo diario de 12 horas de luz artificial (8:00 a 20:00 horas) y 12 horas de oscuridad. Se distribuyeron 2 ó 3 animales por caja de 1000 cm² de superficie basal.

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

2. DIETAS EXPERIMENTALES.

En este trabajo se utilizaron tres dietas semisintéticas con la misma composición cualitativa pero distinto contenido lipídico: dieta control normolipídica m3, dieta hiperlipídica de aceite de maíz M20 (rica en ácido linoleico -18:2n-6-) y dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra mO20 (rica en ácido oleico -18:1n-9- y componentes bioactivos). Todas ellas fueron diseñadas y preparadas en el laboratorio donde se realizó este trabajo y su idoneidad para este ensayo fue anteriormente demostrada ([4303], [2567], [2568]). Este aspecto es de gran relevancia dado que la dieta constituye la variable experimental más

importante de los estudios sobre la influencia de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental. Para poder asegurar que los resultados obtenidos se deben específicamente a las variaciones de la dieta es imprescindible que ésta sea equilibrada para la rata y que no contenga sustancias que afecten la carcinogénesis mamaria. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 2, y en las Tablas 3, 4 y 5 se indica la composición de los aceites utilizados. Los componentes empleados y el material necesario para su preparación se describen a continuación. Las dietas fueron preparadas en tandas de 4 Kg. A lo largo de todo el ensayo se elaboraron un total de 684 Kg de dieta para la serie experimental 1 y 525 Kg de dieta para la serie experimental 2.

COMPONENTES:

- Lípidos:
 - Aceite refinado de germen de maíz (ver composición en las Tablas 3, 4 y 5).
 - Aceite de oliva virgen extra (ver composición en las Tablas 3, 4 y 5).

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

- Proteínas: Caseína láctica (J. Escuder S.L).
- Carbohidratos: Dextrosa (J. Escuder S.L.).
- Fibra: Celulosa comestible microcristalina -AVICEL PH 102- (J. Escuder S.L).
- Vitaminas:
 - Liposolubles: DL- α -tocoferol acetato (E), retinol acetato (A), fitomenadiona (K₁) (J. Escuder S.L.); colecalciferol (D3) (Sigma-Aldrich, Química, S.A.).
 - Hidrosolubles: Bitartrato de colina, inositol, ácido ascórbico (C), ácido nicotínico, pantotenato cálcico, aneurina (B1), riboflavina (B2), clorhidrato de piridoxina (B6), ácido fólico, biotina, cobalamina (B12) (J. Escuder S.L).
 - Minerales: Fosfato dipotásico (K₂HPO₄), carbonato cálcico (CaCO₃), fosfato monocalcico (CaHPO₄), sulfato magnésico monohidratado (MgSO₄·H₂O), cloruro sódico (NaCl), citrato ferroso amoniacal (C₆H₅O₇FeNH₄), sulfato de manganeso monohidratado (MnSO₄·H₂O), cloruro de zinc (ZnCl), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl₂·6H₂O), yoduro potásico (KI) (J. Escuder S.L.).

MATERIAL:

- Balanza de precisión *Sartorius-Werke GMBH* (minerales y vitaminas); Balanza *Sartorius Universal* -precisión centésimas- (ingredientes mayoritarios); Batidora

semiindustrial *Kenwood A901* (mezcla de ingredientes minoritarios); Batidora industrial *Vimar 15/351* (mezcla final).

- Otros: material de pesada, espátulas, recipientes de plástico con cierre hermético, bolsas deplástico, aparato doméstico de vacío y soldado.

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta).

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

* La composición en sales y vitaminas detallada para la dieta m3 es común a todas las dietas experimentales utilizadas.

Tabla 3. Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados en la serie experimental 1.

PARÁMETRO	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
C16:0 (palmítico)	11.1	13.2
C16:1 (palmitoleico)	0.2	1.3
C17:0 (margárico)	0.1	0.1
C17:1 (margaroleico)	-	0.2
C18:0 (esteárico)	2.3	2.5
C18:1 trans (elaídico)	0.1	-
C18:1 (oleico)	31.7	73.7
C18:2 trans (isómeros linoléicos)	1.3	-
C18:2 (linoleico)	51.3	7.3
C18:3 trans (isómeros linolénicos)	0.3	-
C18:3 (linolénico)	0.5	0.8
C20:0 (araquidónico)	0.5	0.4
C20:1 (eicosenoico)	0.2	0.3
C22:0 (behénico)	0.2	0.1
C24:0 (lignocérico)	0.2	0.1
RESUMEN ÁCIDOS GRASOS (%)		
Saturados	14.4	16.4
MUFA	32.1	75.5
PUFA n-6	51.3	7.3
PUFA n-3	0.5	0.8

Tabla 4. Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados en la serie experimental 2.

PARÁMETRO (unidad)	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
C16:0 (palmítico)	10.8	9.81
C16:1 (palmitoleico)	0.1	0.71
C17:0 (margárico)	0.1	0.14
C17:1 (margaroleico)	-	0.22
C18:0 (esteárico)	2	3.19
C18:1 trans (elaídico)	0.0	-
C18:1 (oleico)	31.1	76.17
C18:2 trans (isómeros linoléicos)	-	-
C18:2 (linoleico)	53.7	8.06
C18:3 trans (isómeros linolénicos)	0.9	-
C18:3 (linolénico)	0.5	0.76
C20:0 (araquidónico)	0.3	0.42
C20:1 (eicosenoico)	-	0.31
C22:0 (behénico)	0.2	0.12
C24:0 (lignocérico)	0.3	0.06
RESUMEN ÁCIDOS GRASOS (%)		
Saturados	13.9	13.74
MUFA	31.2	77.41
PUFA n-6	53.7	8.06
PUFA n-3	0.9	0.76

Tabla 5. Otros compuestos analizados de los aceites utilizados en la serie experimental 1.

PARÁMETRO (unidad)	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
COMPOSICIÓN ESTERÓLICA		
(respecto al total de esteroides)		
Esteroides totales (mg/Kg)	7758	1639
Colesterol (%)	0.2	0.1
Brassicasterol (%)	-	-
24-metilen colesterol (%)	1.2	0.2
Campesterol (%)	16.5	2.6
Campestanol (%)	1.6	0.1
Estigmasterol (%)	6.0	0.8
Delta-7-campesterol (%)	0.2	-
Clerosterol (%)	0.8	1.3
Beta-sitosterol (%)	62.6	88.2
Sitostanol (%)	4.3	0.7
Delta-5-avenasterol (%)	4.0	5.0
Delta-5,24-estigmastadienol (%)	0.5	0.5
Delta-7-estigmastenol (%)	1.1	0.3
Delta-7-avenasterol (%)	1.0	0.2
ALCOHOLES (mg/Kg)		
Alcoholes grasos alifáticos	176	663
Alcoholes triterpénicos	3919	9164
Eritrodiol (dialcohol triterpénico)	12	20
TOCOFEROLES (mg/Kg)		
Alfa-tocoferol	380	232
Beta-tocoferol	12	4
Gamma-tocoferol	1201	28
Delta-tocoferol	45	-
Alfa-tocotrienol	116	-
Gamma-tocotrienol	38	-
HIDROCARBUROS (mg/Kg)		
Hidrocarburos esteroideos	940	-
Escualeno	485	5745
PIGMENTOS CLOROFÍLICOS		
Feofitinas (mg/Kg)	-	16.1
CAROTENOS (mg/Kg)		
Beta-caroteno (mayoritario)	1.2	7.0
COMPUESTOS FENÓLICOS (mg/Kg)		
Hidroxitirosol (HTy)	-	17.0
Tirosol (Ty)	-	11.8
Ácido vanílico	-	0.4
Vanillina	-	0.2
Ácido p-cumárico	-	0.4
Ácido ferúlico	-	1.6
Acetato hidroxitirosilo	-	6.9
Acetato tirosilo	-	3.7
Forma dialdehídico del aglucón de la decarboximetil-oleuropeína (derivado del HTy)	-	37.6
Forma dialdehídica del aglucón del decarboximetil-ligustrósido (derivado del Ty)	-	33.2
Forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína (derivado del HTy)	-	38.2
LIGNANOS (mg/Kg)		
Pinoresinol	-	3.1
Acetoxipinoresinol	-	8.0
FLAVONAS (mg/Kg)		
Luteolina	-	10.0
Apigenina	-	4.3

3. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS.

MATERIAL:

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

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

El carcinógeno se administró a los animales a los 53 días de edad. Se suministró una única dosis de DMBA mediante instilación buco-gástrica con un catéter conectado en su extremo proximal a una jeringuilla de 1 ml, con el animal previamente inmovilizado. Durante la instilación se adoptaron todo tipo de precauciones para evitar la contaminación de la zona bucal externa del animal y controlar la formación de gotas en el extremo distal del catéter. La dosis única de carcinógeno fue de 5 mg de DMBA/animal correspondiente a 1 ml de la solución de aceite en la serie experimental 1, y de 10mg de DMBA/animal correspondiente a 1 ml de la solución de aceite en la serie experimental 2. En el caso de esta segunda serie experimental, dado el interés de los sacrificios tras las 12 y las 24 horas de la inducción se registró la hora exacta de la administración del DMBA para sacrificar los animales en las correspondientes horas posteriores con la mayor precisión posible.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

4.1. SERIE EXPERIMENTAL 1.

Esta serie experimental formó parte de una serie más amplia desarrollada previamente en el laboratorio, en la que se estudió el efecto de los lípidos de la dieta en los diferentes estadios de la carcinogénesis, y que contenía 5 grupos experimentales y 167 animales en total. Dado que el objetivo del presente trabajo era la iniciación de la carcinogénesis solamente tres de estos grupos experimentales, con un total de 117 animales, fueron estudiados.

El día posterior a su llegada, 6 animales fueron sacrificados (tal y como se detalla más adelante) y el resto fueron distribuidos en 3 grupos experimentales: control ($1C_i$), maíz ($1M_i$) y oliva ($1O_i$), formados por 37 animales cada uno. En todos los grupos, los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, el día 22-23 de vida. A partir de ese día y hasta el final del ensayo, se les administraron las distintas dietas experimentales, m3, M20 o mO20. Tal como se muestra en la Figura 15, los animales del grupo control $1C_i$ recibieron dieta normolipídica durante todo el ensayo, mientras que los animales de los grupos $1M_i$ y $1O_i$ recibieron dieta M20 y mO20, respectivamente.

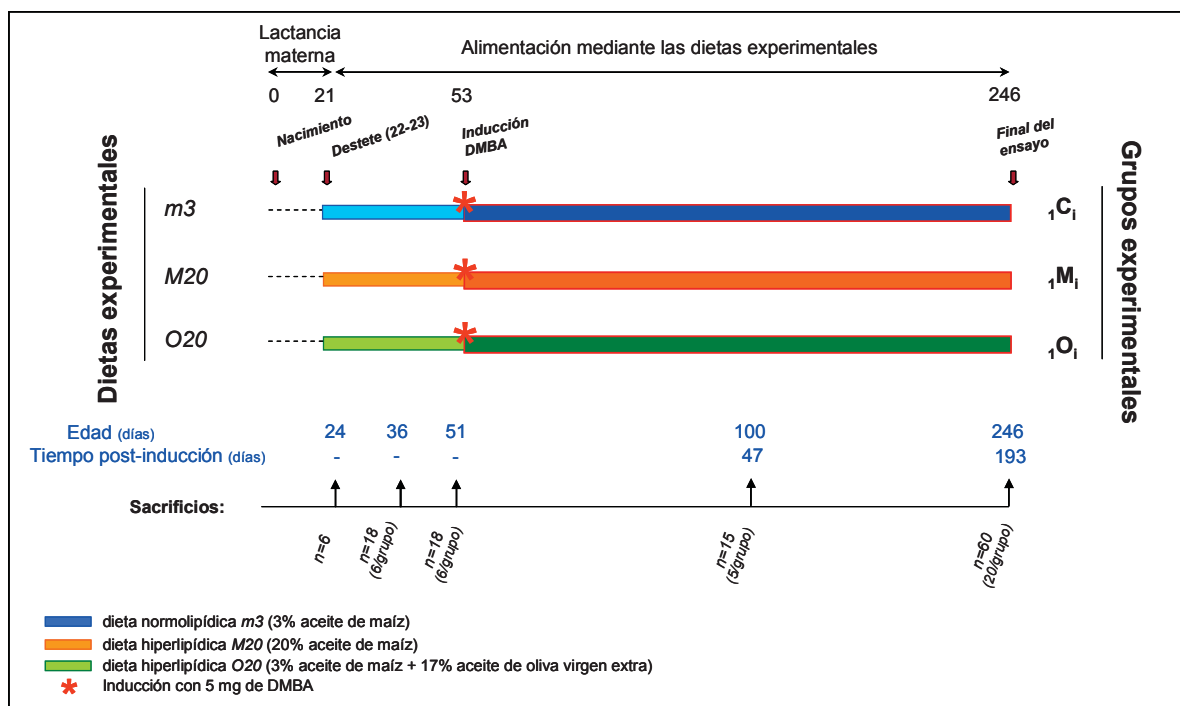


Figura 15. Diseño experimental de la serie 1.

Todos los animales fueron inducidos el día 53 -día 0 del tiempo post-inducción- con una dosis única de 5 mg de DMBA. Como el carcinógeno se administró vehiculizado en un lípido, a fin de evitar problemas de absorción, los animales de los grupos $1M_i$ y $1O_i$ recibieron dieta normolipídica durante dos días antes y un día después de la inducción.

A partir del destete, los animales fueron pesados e inspeccionados semanalmente (tal y como se detallará en el subapartado 5 de este capítulo). Los días 24, 36, 51, 100 y 246 se sacrificaron los animales. Debido a que a los 24 días aún no había diferencias de dieta entre los animales, se procesaron 6 de ellos con independencia de los grupos experimentales. A los 36 y 51 días de edad se sacrificaron 6 animales de cada grupo; a la edad de 100 días se procesaron 5 animales de cada grupo; y al final del estudio, a 246 d.e., se sacrificaron 20 animales por grupo. Previamente a cada sacrificio se obtuvo el peso y la longitud naso-anal de cada rata. Además, no se sacrificó más de una rata por caja y día para evitar el estrés generado por la denominada “sensación inminente de peligro” que se produce en el resto de los animales de la misma caja ([1310], [6864]). Con el fin de respetar el ritmo circadiano de algunas hormonas, el sacrificio se realizó entre las 10:00 y las 13:00 horas, tras dejar a los animales en su hábitat normal durante un mínimo de 1 hora 30 minutos desde su manipulación. Inmediatamente después del sacrificio de cada animal, se procedió a la necropsia y la obtención de las muestras biológicas de interés para este trabajo (hígado y glándula mamaria), así como otras necesarias para diferentes líneas de investigación del laboratorio (sangre total, útero, ovarios, cerebro, vísceras y tumores experimentales).

4.2. SERIE EXPERIMENTAL 2.

El estudio estuvo integrado por 355 animales. El día posterior a su llegada (día 23-24 de edad de las ratas), 10 animales fueron sacrificados y el resto fueron distribuidos en 3 grupos experimentales: control ($2C$), maíz ($2M$) y oliva ($2O$), de 115 animales cada uno. En todos los grupos, los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, el día 22-23 de vida. A partir de ese día y hasta el final del ensayo se les administraron las distintas dietas experimentales, m3 para el grupo $2C$, M20 para el grupo $2M$, y mO20 para el grupo $2O$.

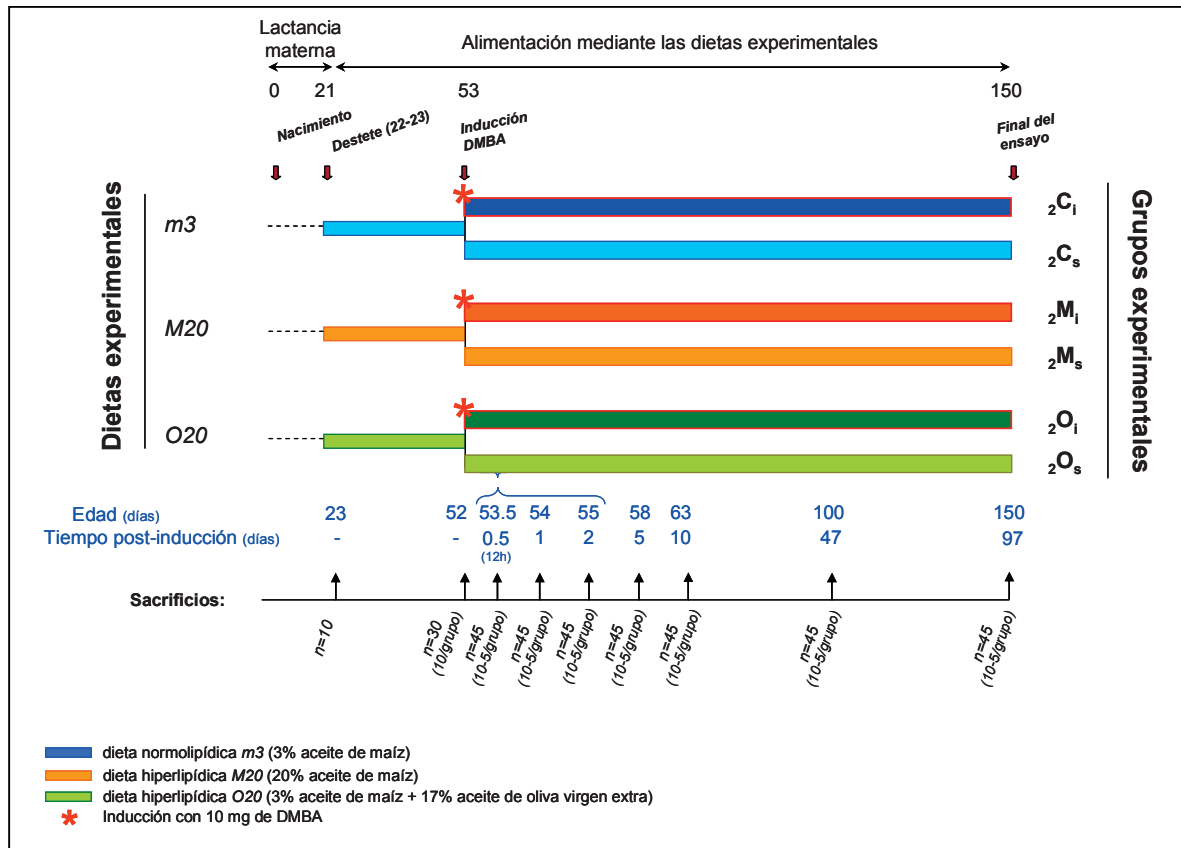


Figura 16. Diseño experimental de la serie 2.

A 52 d.e., 10 animales de cada grupo fueron sacrificados y el resto divididos a su vez en dos subgrupos, animales inducidos y animales sanos (Figura 16). Los resultados obtenidos en este sacrificio proporcionaron una información sobre la situación basal, pre-inducción, para cada una de las dietas experimentales. Los animales quedaron así distribuidos de la siguiente manera: grupos de animales inducidos $2C_i$, $2M_i$ y $2O_i$, con 70 animales cada uno, y grupos de animales no inducidos o sanos $2C_s$, $2M_s$ y $2O_s$, con 35 animales cada uno. A 53 d.e. - día 0 del tiempo post-inducción-, los animales de los grupos $2C_i$, $2M_i$ y $2O_i$ fueron inducidos con una dosis única de 10 mg de DMBA vehiculizado en 1 ml de aceite de maíz. Los animales de los grupos $2C_s$, $2M_s$ y $2O_s$, recibieron 1 ml del vehículo sin carcinógeno. Este diseño fue desarrollado específicamente, a partir de los resultados obtenidos en la serie experimental 1, de forma que se pudiera estudiar el posible efecto de los lípidos de la dieta sobre el metabolismo del DMBA especialmente en las primeras horas tras su administración. Los grupos de animales no inducidos o sanos cumplieron la doble función de actuar como controles de los grupos de animales a los que se administró el DMBA, y de permitir el estudio

de las enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos en situación basal (sin carcinógeno).

A partir del destete, los animales fueron pesados e inspeccionados semanalmente. En los 53.5, 54, 55, 58, 63, 100 y 150 d.e. (12, 24 y 48 horas, 5, 10, 47 y 97 días post-inducción, respectivamente) se sacrificaron 10 animales de cada grupo de animales inducidos ($2C_i$, $2M_i$ y $2O_i$) y 5 de los grupos de animales sanos ($2C_s$, $2M_s$ y $2O_s$).

Del mismo modo que en la serie 1, previamente a cada sacrificio se obtuvo el peso y la longitud naso-anal de cada rata. Además, no se sacrificó más de una rata por caja y día para evitar la mencionada “sensación inminente de peligro” del resto de los animales de la misma caja. El sacrificio se realizó entre las 10:00 y las 13:00 horas, tras dejar a los animales en su hábitat normal durante un mínimo de 1 hora 30 minutos desde su manipulación, con la excepción del sacrificio de día 53.5 (12 horas post inducción). Dado que la hora de la inducción con el carcinógeno se realizó entre las 8 y las 12 horas de la mañana, este sacrificio se efectuó entre las 20 y 24 horas del día 53, respetando el ciclo luz/oscuridad de los animales. Inmediatamente después del sacrificio de cada animal, se procedió a la necropsia y la obtención de las diferentes muestras biológicas de interés (sangre total, hígado y glándula mamaria), así como los tumores experimentales en los sacrificios de día 100 y 150 (final del estudio). Además otros tejidos como el adiposo, cerebro y vísceras fueron recogidos y utilizados para otros trabajos del laboratorio.

5. EXPLORACIONES PERIODICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA.

MATERIAL:

- Balanza *Sartorius MCI* (Laboratory LC6200).
- Centrífuga *Centrosix Tabletop Centrifuge* (JP Selecta S.A.).
- Éter etílico, caja de anestesia.
- Formol al 4%.
- Equipo de anestesia inhalatoria.
- Guillotina, tijeras, bolsas de plástico cónicas con extremo distal abierto.
- Herramientas de disección.
- Microscopio *Laborlux II* (Leitz).
- Suero fisiológico (ClNa 0.9%).

- Tampón fosfato salino (PBS -NaCl 0.137 mM, KCl 2.689 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 9.996 mM, KH₂PO₄ 1.763 mM, pH 7.4-).
- Tubos K2EDTA, *Vacurette* (Greiner bio-one).
- Otros: algodón, embudos, gradillas, espátulas de algodón, portaobjetos, cubreobjetos, recipientes de cristal, pipetas Pasteur, jeringuillas y agujas, etc.

Tal como ya se ha mencionado, los animales fueron explorados semanalmente mediante inspección, palpación y determinación del peso corporal. En la serie experimental 2, además, se efectuó la medida de la longitud naso-anal. Estas exploraciones semanales permitieron: 1) el estudio de la evolución ponderal, 2) la detección, localización y determinación de los dos diámetros mayores de los nódulos tumorales, 3) efectuar el control de la calidad de las series, investigando la posible presencia de otras patologías, generales ([855], [1387], [1390]) o por desequilibrios nutricionales ([827], [905], [5742]). Para el estudio del crecimiento se estudió la masa corporal de los animales utilizando el Índice de Lee, específico para rata [$\{(\text{peso corporal -g})^{1/3} / (\text{longitud naso-anal -mm-})\} \times 10000$] ([839]), y el Índice de Masa Corporal (peso -g-/longitud -cm²-).

Por otro lado, las palpaciones comenzaron el día 74 de edad de los animales (21 post-inducción) en la serie experimental 1, y el día 71 (18 post-inducción) en la serie experimental 2. Éstas se realizaron de forma sistemática a fin de determinar la aparición, localización y el contenido tumoral. Asimismo, se midieron los dos diámetros mayores de cada tumor mediante un nonius para calcular el crecimiento tumoral a través del volumen estimado. Dichas palpaciones se realizaron sobre el animal colocado en posición anatómica normal, situado frente al operador y con la cabeza por delante. El animal se sujetaba suavemente con las dos manos y, simultáneamente, se le palpaban las zonas laterales longitudinales desde la base del cuello hasta la zona inguinal y alrededores de la cola. Además, se realizaba la misma operación a lo largo de la zona central y de ambos lados del cuello. El método de palpación consistió, básicamente, en pinzar los nódulos, a través de la piel, con el pulgar y el índice y, posteriormente, presionar a lo largo del cuerpo con el dedo plano a fin de descubrir las pequeñas irregularidades (Figura 17.A).

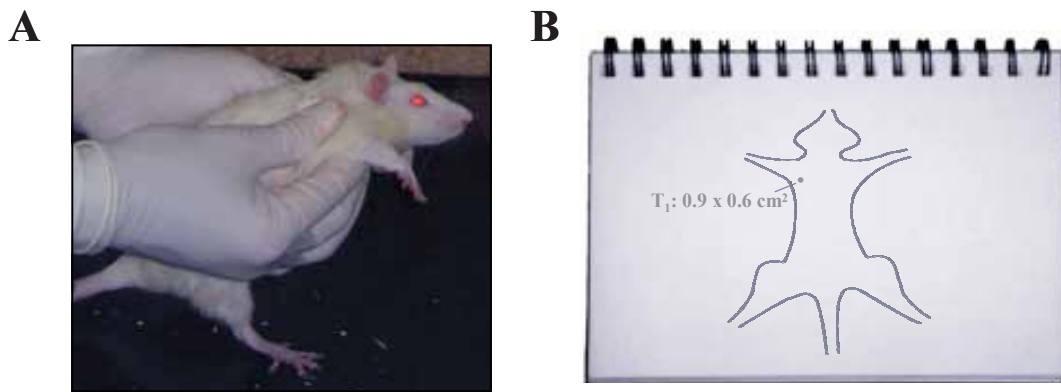


Figura 17. Exploraciones periódicas de los animales. (A) Imagen representativa de la palpación de una rata. (B) Esquema utilizado para la transcripción de los resultados de la exploración.

Los nódulos encontrados en cada exploración se emplazaron en un esquema corporal para cada una de las ratas (Figura 17B).

La eutanasia de los animales se realizó por decapitación troncular en el caso de la serie experimental 1. En la serie experimental 2, el animal fue anestesiado con isofluorano y exanguinado mediante punción cardíaca. El isofluorano es un compuesto que no experimenta metabolismo hepático y no genera alteraciones en este tejido siendo, por tanto, válido para los estudios posteriores. Por otra parte, la extracción sanguínea por punción cardíaca permite extraer el máximo volumen de sangre sin provocar coagulación ni rotura de eritrocitos y células plasmáticas. Una vez realizadas estas maniobras se procedió a la decapitación troncomedular para trabajar simultáneamente con la cabeza y el resto del cuerpo del animal. Tras el sacrificio, se procedía a la limpieza exhaustiva de todo el material y a la ventilación de la sala antes de continuar con el siguiente animal ([6864]). El horario del sacrificio, la edad de los animales y la selección y el número de animales sacrificados por caja y día ya han sido indicados en el subapartado anterior. Con la máxima rapidez posible desde su obtención, la sangre se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma de los elementos formes. Ambas fases se almacenaron a -20°C , y tras su congelación los plasmas fueron transferidos a -80°C . En el caso de los sacrificios a 100 días y final, se procedió, paralelamente, a la exéresis de los tumores. De cada uno de ellos se determinaron los 3 diámetros mayores y se separó una parte representativa que fue fijada en formol al 4% para su posterior estudio anatomopatológico. El resto de la muestra tumoral se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó posteriormente a -80°C . En relación a las glándulas mamarias, se realizó la

exéresis de las abdominales y torácicas del lado izquierdo y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C . Estas glándulas se destinaron a estudios de biología molecular. Por otro lado, las glándulas contralaterales (derechas) así como un fragmento de hígado fueron fijados en formol al 4% para estudios histológicos. Finalmente, se procedió al eviscerado del animal. Los tejidos se lavaron en suero fisiológico y rápidamente se congelaron en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C . La necropsia completa de los animales se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la guía de Rowet ([566]).

B. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS.

MATERIAL:

- Microscopio óptico *Nikon Eclipse E800*.
- Set de tinción (Diapath).
- Microscopio óptico *Olympus BX51* con cámara *Olympus DP70*.
- Programas de análisis: *Visiopharm Integrator System* (Olympus) y *MetaMorph Image Analysis Software* (Molecular Devices LLC).
- Otros: vitrina de gases, agitador, estufa, nevera a $+4^{\circ}\text{C}$, baño, portaobjetos, cubreobjetos.

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

1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES.

El estudio histopatológico se realizó en colaboración con un médico especialista en anatomía patológica. Las muestras se fijaron en formol al 4%, y se incluyeron en parafina. Se practicaron varios cortes de cada muestra (de 1 a 3) de $4\ \mu\text{m}$ de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina. El diagnóstico de las biopsias tumorales se basó esencialmente en los criterios de Young S y Hallows RC ([1141]).

2. INMUNODETECCIÓN DE LOS ADUCTOS DMBA-ADN EN LA GLÁNDULA MAMARIA.

El protocolo descrito por Santella RM y Zhang YJ ([7241]) para la inmunodetección de aductos de benzo(a)pireno-ADN fue adaptado para medir los aductos DMBA-ADN formados en glándula mamaria de rata de este trabajo. Esta técnica se llevó a

cabo en los laboratorios de la Dra. Regina M. Santella, en la Universidad de Columbia, por el doctorando.

El ensayo se realizó a partir de secciones de 4 μm de grosor de muestras de glándula mamaria incluidas en parafina. Los portaobjetos conteniendo las muestras de glándula mamaria parafinadas fueron incubados durante una hora a 55°C para fundir la parafina. A continuación, se realizaron tres lavados en xileno durante cinco minutos cada uno. Sucesivamente se introdujeron las muestras en etanol 100%, 95% y agua dos veces y durante cinco minutos en cada solución. El área de de las secciones fue delimitada con un *ImmEdge Pen* (Vector Laboratories, Inc.) evitando tocar los bordes. Posteriormente, se realizaron dos lavados de cinco minutos en PBS en agitación, tras lo cual las muestras fueron cubiertas con una solución RNasa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (RNase Solution, Sigma-Aldrich) e incubadas durante una hora a 37°C en una cámara húmeda y lavadas dos veces con PBS. Seguidamente, se trataron las muestras con una solución 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Proteinasa K (Sigma-Aldrich) en *buffer* Tris durante diez minutos a temperatura ambiente y se lavaron en PBS dos veces. El ADN fue desnaturalizado tratando las muestras con una solución de HCl 4N durante 10 minutos. Posteriormente, esta solución fue inactivada incubando las muestras con una solución 50mM Tris base durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS. La actividad peroxidasa endógena fue bloqueada mediante un tratamiento con una solución 0,3% de H_2O_2 en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente tras lo que se realizaron tres lavados en PBS. El bloqueo de las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante de *Vectastain Elite Mouse IgG ABC kit* (Vector Laboratories, Inc.), incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Mientras tanto se preparó la solución del anticuerpo 8E11, producido y proporcionado por el laboratorio de la Dr. RM Santella, a una dilución 1:100 en la misma solución de bloqueo del *ABC kit*. Esta solución de anticuerpo se añadió tras la incubación de bloqueo eliminando esta primera solución y añadiendo la del anticuerpo. Se incubó durante toda la noche (12-14 horas) a 4°C en una cámara húmeda.

A la mañana siguiente las muestras fueron lavadas con PBS tres veces. Seguidamente, se añadió la solución de anticuerpo secundario proporcionada por el *ABC kit* y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las muestras fueron lavadas tres veces en PBS y se incubaron con el *ABC Reagent* proporcionado por el kit durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente las

muestras se lavaron tres veces con PBS, se enjuagaron durante 30 segundos en una solución de Triton-X 100 al 1% en PBS y se volvieron a lavar en PBS. Seguidamente, se añadió el reactivo Diaminobencidina (DAB) proporcionado por el *Vectastain DAB kit* (Vector Laboratories, Inc.) y se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con agua corriente tres veces durante 5 minutos y se procedió a su deshidratación sucesiva en soluciones de etanol del 95% y 100% durante 5 minutos dos veces cada una, y xileno tres veces durante cinco minutos. Las muestras fueron montadas añadiendo el medio *Permount* (Thermo Fisher Scientific) y cubriendo con un cubreobjetos.

Se analizaron un total de 159 muestras pertenecientes a la serie experimental 2, divididas de la siguiente forma: sacrificio de día 52 (24 horas pre-inducción): 15 muestras, 5 por grupo (${}_2C$, ${}_2M$ y ${}_2O$); sacrificios de día 53.5, 54, 55 y 58 (12, 24, 48 y 72 h post-inducción): 120 muestras, 10 por grupo inducido (${}_2C_i$, ${}_2M_i$ y ${}_2O_i$); y 24 muestras, 2 por grupo sano (${}_2C_s$, ${}_2M_s$ y ${}_2O_s$). De cada muestra se capturaron 5 campos con el Microscopio óptico *Olympus BX51*, la cámara *Olympus DP70* y el sistema informático *Visiopharm Integrator System* (Olympus) a un aumento 40X. De cada uno de estos campos se cuantificaron al azar 20 núcleos de células lobulillares de la glándula mamaria utilizando el programa informático *MetaMorph Image Analysis Software* (Molecular Devices LLC). Los resultados obtenidos de las muestras no tratadas con DMBA (sacrificio de día 52 y muestras C_s , M_s y O_s del resto de sacrificios) fueron utilizados para establecer un nivel basal de detección de la técnica y utilizadas para relativizar los resultados de las muestras tratadas correspondientes de cada grupo.

C. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

MATERIAL:

- Autoclave *SterilClav-75 Dry* (Raypa).
- Cabina de Flujo Laminar Vertical *FLV60* (EURO AIRE - Tecnología para Diagnóstico e Investigación s.a.).
- Centrífuga 5415R (Eppendorf).
- Centrífuga refrigerada *Sorvall® RC-6* (DuPont Instruments).
- Ultracentrífuga *Sorvall™ WX*, rotor 70.1-Ti.

- Sonicador, *Ultrasonic Homogenizer*. Modelo 3000 (Biologics, INC).
- Brazo del sonicador, *Titanium Micro Tip*, 0-120-0005 (Biologics, INC).
- Equipo de homogenización de tejidos *Polytron* (Kinematica).
- Equipo de *Real Time-PCR MyiQ5-iCycle* (Bio-rad Laboratories).
- Espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo scientific).
- Lector de placas *NanoQuant infinite M200* y programa *Tecan i-control 1.6* (Tecan).
- Microcentrifuga *Microfuga™ 11* (Beckman).
- Programa de análisis de imagen: *Quantity One™* (BioRad).
- Sistema de captura de imágenes en tiempo real *Gel Doc 2000* (BioRad).
- Termociclador *Techné* (Progene).
- Unidad de electroforesis *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (BioRad).
- Unidad de transferencia electroforética *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell*.
- *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (BioRad).
- *ChemiDoc™ XRS+* acoplado al programa informático *Image Lab™ Software version 5.1* (BioRad).
- Otro material: Congelador de -80°C *Ultima II* (REVCO), combinado de nevera de +4°C y congelador de -20°C (Liebherr), agitadores magnéticos y orbitales, vórtex, contenedores de nitrógeno líquido, máquina de hielo, estufas, balanzas de precisión, baños con control de temperatura, cubetas de electroforesis horizontales, bandejas, peines electroforesis.

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

1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL.

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

- Se trabajó siempre con guantes y éstos fueron sustituidos frecuentemente.
- Los reactivos y el material para la manipulación del ARN fueron marcados y guardados por separado.
- El material metálico y de vidrio se trató con calor incubándolo a +200°C durante toda la noche (12-14 horas).

- Las superficies de trabajo y las pipetas automáticas utilizadas fueron tratadas con solución inhibidora de RNasas (*RNasa Away* -Molecular BioProducts-).

La extracción de ARN total a partir de muestras de hígado, se realizó siguiendo el procedimiento del kit *RNeasy Tissue* (Qiagen), basado en la unión del ARN a una membrana de partículas de sílice en presencia de una elevada concentración de sales. Se pesaron 30 mg de tejido tumoral pulverizado en un tampón desnaturalizante que contenía β -mercaptoetanol y tiocianato de guanidina para inactivar las RNasas, asegurando así una buena purificación de ARN intacto. Se utilizó un *Polytron* (Kinematica®) para la homogenización del tejido. Tras una centrifugación de 3 minutos a máxima velocidad, el ARN quedó en la fase acuosa mientras que el ADN y las proteínas quedaron retenidos en la interfase y en la fase orgánica. El ARN se unió a una membrana de sílica y se lavó con diferentes soluciones provistas por el kit. Finalmente, el ARN se recuperó por elución con H₂O libre de RNasas y fue almacenado a -80°C.

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

La integridad y la pureza del ARN extraído, así como su cuantificación, fueron determinadas mediante el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo scientific). La pureza del ARN extraído se midió a través de las ratios de absorbancia de 260/280 y 260/230 nm, cuyos valores próximos a 2.0 y entre 2.0-2.2, respectivamente, indican un ARN libre de contaminaciones de proteínas, compuestos fenólicos, EDTA y carbohidratos, entre otros.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (Real Time PCR).

La PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa, es un método donde la amplificación y cuantificación del ADN se producen de forma simultánea. Dicha técnica fue empleada para cuantificar el ARN mensajero a partir de las muestras de ADN complementario (ADNc), el cual se sintetizó a partir de 2 μ g de ARN total utilizando el sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem). Las muestras fueron incubadas con 10 μ l de *RT mix* durante 10 minutos a +25°C, 120 minutos a +37°C y,

finalmente, 5 segundos a +85°C. El ADNc resultante fue diluido a una concentración de 25 ng/ μ L y posteriormente almacenado a -20°C.

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

Para el análisis de expresión de genes en glándula mamaria e hígado se utilizó la metodología *TaqMan*[®] (Applied Biosystem). Se amplificaron 25 ng de ADNc utilizando la mezcla de reactivos *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystem) y el ensayo *TaqMan*[®] apropiado en un volumen final de 25 μ l. Cada ensayo contiene los *primers* y una sonda marcada fluorescentemente, específica para el gen de estudio. Las características de cada ensayo *TaqMan*[®] utilizado se encuentran detalladas en la Tabla 6. Todas las muestras fueron amplificadas por duplicado en un equipo *MyiQ-iCycler* (BioRad Laboratories) con el siguiente programa: 1 ciclo de +95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos de +95°C durante 15 segundos y +60°C durante 60 segundos. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (sin ADNc).

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

Tabla 6. Ensayos TaqMan® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante Real Time-PCR.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Ref. TaqMan®
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Rn00487218_m1
Cyp1a2	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	Rn00561082_m1
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	Rn00564055_m1
Gstp1	glutathione S-transferase pi 1	Rn00561378_gH
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Rn00566528_m1
Ahr	aryl hydrocarbon receptor	Rn00565750_m1
Nrf2/Nfe2l2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	Rn00477784_m1
Hsp90	Hypoxanthine- Guanine Phosphoribosyl Transferase 1	Rn01527840_m1

Ref.: Referencia de los ensayos TaqMan® (Applied Biosystem).

3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES.

A partir de las muestras de glándula mamaria y de hígado conservadas a -80°C se realizaron diferentes extractos proteicos según el tipo de purificado proteico necesario posteriormente.

3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS Y MICROSOMALES.

La extracción de proteínas citosólicas y microsomales se realizó según un protocolo modificado y adaptado a partir de los de Duncan RE *et al.* ([8202]) y Reinhardt TA *et al.* ([8203]).

En el caso del hígado se partió de tejido parcialmente pulverizado y conservado a -80°C. Se pesaron 200 mg de tejido directamente en un *ependorf* conteniendo 800 µL de *Buffer* de Homogenización (250 mM sacarosa, 20 mM Tris HCl pH 7.4) preparado durante el día de su utilización y previamente enfriado a 4°C. La relación peso muestra/volumen *buffer* fue de 1/4. Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido o nieve carbónica antes de introducirlas en el *ependorf* para evitar su descongelación y todo el procedimiento posterior se realizó a una temperatura entre 0 y 4°C.

La homogeneización de las muestras se realizó de forma manual mediante la utilización de un émbolo de plástico directamente en los tubos *ependorf* mantenidos en hielo. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 10000 xg a +4°C en una Centrífuga 5415 R (*Eppendorf*). Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se depositó en un tubo de ultracentrífuga de 10 mL previamente enfriado en hielo. El *pellet* conteniendo restos de tejido no homogeneizado así como otros restos celulares de gran tamaño, como núcleos, membranas plasmáticas y mitocondrias, fue descartado.

Los tubos de ultracentrífuga conteniendo los sobrenadantes de cada muestra fueron apropiadamente equilibrados e introducidos en la Ultracentrífuga *Sorvall*, rotor 70.1-Ti, previamente enfriados a +4°C y ultracentrifugados durante 1 hora a 105,000 xg equivalentes a 39,200 rpm. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citosólica del extracto, fue recuperado en un tubo de 5 ml previamente enfriado y diluido en cuatro volúmenes de *buffer* de homogeneización (dilución 1/5). Por otra parte, el *pellet*, correspondiente a la fracción microsomal, con el objetivo de purificarlo y eliminar posibles restos de componente citosólicos, fue resuspendido en 2 mL de *Buffer* de Resuspensión de Microsomas (0.1 M NaHPO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) y ultracentrifugado de nuevo en las mismas condiciones (105,000 xg, 60 minutos, +4°C). Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* resuspendido en 200 µL del mismo *buffer*. Ambos extractos fueron alicuotados, cuantificada su concentración proteica mediante el método de *Lowry DCTM Protein Assay* (Biorad) y conservados a -80°C.

Se comprobó la correcta separación entre fracción microsomal y citosólica mediante la inmunodetección por Western Blot (proceso que se detallara más adelante) de dos proteínas citosólicas, Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa (GADPH), y de Citocromo P450 Reductasa (CPR) como marcador microsomal, en ambas fracciones celulares.

Con respecto a los extractos de glándula mamaria, debido a que ésta es más rica en tejido graso y la cantidad disponible es menor, se realizaron las siguientes modificaciones para optimizar la separación citosólica y microsomal. Se pesaron 100 mg de tejido directamente en un tubo de vidrio para homogeneización de 5 mL conteniendo 400 µL de *Buffer* de Homogenización, previamente enfriado. Se homogeneizó el tejido con un *potter* de vidrio, con mayor potencia de degradación que el de plástico, hasta eliminar en lo posible los fragmentos macroscópicos de tejido. Se transfirió todo el contenido a un tubo *ependorf* y se

centrifugó bajo las mismas condiciones que en el caso del hígado (20 minutos, 10,000 xg, +4°C). Se recogió el sobrenadante en un tubo de ultracentrifuga de 5 ml y el *pellet* se resuspendió de nuevo en 200 µL de *Buffer* de Homogenización, se volvió a homogeneizar con un émbolo de plástico y se volvió a centrifugar (20 minutos, 10000 xg, +4°C). Este segundo sobrenadante se unió con el primero en el correspondiente tubo de ultracentrifuga y se descartó el *pellet*. A partir de aquí el proceso de ultracentrifugación se realizó de igual forma que para el hígado, con la excepción de que la fracción citosólica no fue diluida tras su separación y la fracción microsomal fue resuspendida en un volumen final de 60 µL de *Buffer* de Resuspensión de Microsomos. Ambos extractos fueron alicuotados, cuantificada su concentración proteica mediante el método de Lowry y conservados a -80°C. Al igual que en hígado, se comprobó la correcta separación entre fracción microsomal y citosólica mediante inmunodetección por Western Blot de las mencionadas proteínas marcadoras.

3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.

Este tipo de extracto proteico se realizó con muestras de hígado parcialmente pulverizadas y conservadas a -80°C mediante el método de Dougherty EJ y Pollenz RS ([7419]) modificado. Se pesaron 50 mg de tejido directamente en un tubo *ependorf* conteniendo 250 µL de *buffer* RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodio deoxicolato y 0.1% SDS en TBS -20mM Tris y 137mM NaCl-). Este *buffer* es ampliamente utilizado en extracciones en las que interesa romper las membranas nucleares. El mismo día de su utilización se suplementó con los inhibidores de proteasas leupeptina (10 µg/mL) y aprotinina (20 µg/mL) y se enfrió a +4°C. Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido o nieve carbónica para evitar su descongelación antes de introducir las en el *ependorf* y todo el procedimiento posterior se realizó a una temperatura entre 0 y +4°C.

Las muestras se homogeneizaron en frío mediante sonicación utilizando un sonicador para muestras de punta o varilla de titanio (*Ultrasonic Homogenizer 3000*) con un diámetro de brazo de 3.8 mm (*Titanium Micro Tip*). El proceso de sonicación constó de las siguientes fases:

- Primera sonicación de 15 segundos a potencia 50.
- Suplementación del homogeneizado con un tercer inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 100 µM.
- Segunda sonicación de 10 segundos a potencia 30.

- Tercera sonicación de 5 segundos a potencia 30.

Para evitar el posible deterioro de las muestras debido al calor producido durante la sonicación, el proceso se realizó por tandas. Se sonicó la primera de las muestras y se dejó enfriar en hielo mientras se realizó la primera sonicación al resto de muestras. Después se realizaron también de forma alternada cada uno de los siguientes pasos, siguiendo siempre el mismo orden de sonificado de las muestras. De esta forma los *ependorfs* se enfriaron entre una sonicación y la siguiente.

Para evitar la contaminación entre muestras, la varilla del sonicador se limpió rociándola con etanol al 70% antes de utilizar el aparato, después de sonificar cada muestra y al acabar. Los tiempos y potencia de sonicación fueron optimizados para la cantidad de tejido utilizada. Una vez finalizado el proceso, los extractos proteicos fueron diluidos en 4 volúmenes de *buffer* RIPA suplementado con Leupeptina y Aprotinina (dilución 1/5), posteriormente alicuotados, cuantificada su concentración proteica mediante el método de *Lowry* para muestras con detergentes, y conservados a -80°C.

4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA. WESTERN-BLOT.

Los extractos proteicos de las muestras de la serie experimental 1, tanto citosólicos, microsomales como totales, fueron utilizados a diferentes concentraciones para determinar los niveles de las distintas proteínas de interés. Así, los extractos citosólicos de hígado y glándula mamaria se utilizaron para medir los niveles de las proteínas GST y NQO1, y de LDH, CPR y GAPDH como control de calidad del proceso de extracción. Los extractos microsomales de hígado y glándula mamaria fueron utilizados para analizar CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, así como LDH, CPR y GAPDH. Finalmente, los extractos hepáticos de proteína total se utilizaron para analizar los niveles de AhR y Nrf2.

Las proteínas fueron preparadas a las concentraciones adecuadas para cada ensayo (Tabla 7). Se les adicionó *Laemli Buffer* (BioRad) con β -mercapto-etanol al 5% en proporción 1:1 y posteriormente fueron desnaturalizadas por tratamiento a +90-+100°C durante 4 minutos. Posteriormente, fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sodico (SDS-PAGE) al 10 o al 12%, según el tamaño de la proteína de interés, durante 1 hora y 30 minutos a +4°C. Las muestras fueron transferidas a una membrana de nylon *Hybond* PVDF (GE Healthcare) a 100 mV durante una hora a +4°C. A continuación, la membrana fue bloqueada con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T 0.1% (20 mM Tris-

HCl, 137mM NaCl, 1 % Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo adecuado a la concentración indicada en la tabla X, durante 16 horas a +4°C en agitación. Tras realizar tres lavados en TBS-T 0.1% durante 12 minutos cada uno en agitación, se incubó la membrana con la solución de anticuerpo secundario (Tabla 7), preparada con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T 0.1%, durante 1h 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, tras realizar lavados con TBS-T 0.1%, las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia, mediante el sistema *Luminata™ Forte Western HRP Substrate* (Millipore) y reveladas en film de autorradiografía (*Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences*). El contenido proteico se determinó por densitometría gracias al sistema de análisis de imágenes *Gel Doc 2000* y el programa *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories). Los valores fueron normalizados al valor medio del triplicado de un control interno y relativizados a μg de proteína.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados y condiciones de los ensayos Western Blot.

Primario	Casa comercial	μg^3 (proteína)	Dilución	Secundarios ¹	Dilución
LDH	Abcam	5 μg	1:3000	cabra	1:10000
CPR	Abcam	5 μg	1:2000	conejo	1:3000
GADPH	Millipore	5 μg	1:2000	ratón	1:5000
CYP1A1	SantaCruz	20 μg	1:500	ratón	1:5000
CYP1A2	Millipore	10 μg	1:2000	conejo	1:10000
CYP1B1	SantaCruz	5 μg	1:3000	conejo	1:5000
GST	UpState	20 μg en hígado y en GM ²	1:2000	conejo	1:5000
NQO1	Abcam	15 μg en hígado y 5 μg en GM ²	1:3000	ratón	1:5000
AhR	SantaCruz	40 μg	1:1000	cabra	1:5000
Nrf2	Abcam	40 μg	1:3000	conejo	1:5000

¹ Todos los anticuerpos secundarios eran conjugados con peroxidasa de rábano y se adquirieron a Sigma-Aldrich.

² Glándula mamaria.

³ Cantidad de proteína cargada en cada pocillo del gel.

5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

A partir de los extractos de proteína citosólicos y microsomales obtenidos en hígado en la serie experimental 2 se realizaron los diversos ensayos de actividad enzimática (EROD, NQO1 y GST). Las muestras procedieron de los sacrificios 24, 52, 53.5, 54, 55, 58, 63 y 100 días, tanto de animales sanos como inducidos.

Todos los ensayos de actividad se llevaron a cabo bajo condiciones de alta precisión y utilizando agua ultrapura (*H₂O Molecular Biology Reagent*, Sigma-Aldrich) y otros reactivos estériles. Los extractos proteicos para poder ser utilizados en ensayos de actividad deben de ser frescos, con menos de 30 días desde su extracción hasta su utilización. Debido a ello, se coordinó la extracción citosólica y microsomal de las 310 muestras de las cuales se analizó su actividad con los ensayos enzimáticos. De esta forma se realizaron 3 tandas de extracción de 92, 92 y 126 muestras cada una, seguidas de sus correspondientes ensayos de actividad entre una tanda y la siguiente.

5.1. ACTIVIDAD EROD.

La actividad enzimática *Ethoxyresorufin-O-deethylase* (EROD) es llevada a cabo principalmente por las enzimas CYP1A1 y CYP1B1, sirviendo así como un marcador de la cantidad y actividad de estas enzimas en determinados tejidos y condiciones a partir de extractos proteicos microsomales. El método original fue descrito por Burke MD y Mayer RT en 1974 ([6908]) y fue adaptado a microplacas de 96 pocillos por Kennedy SW y Jones SP ([6907]).

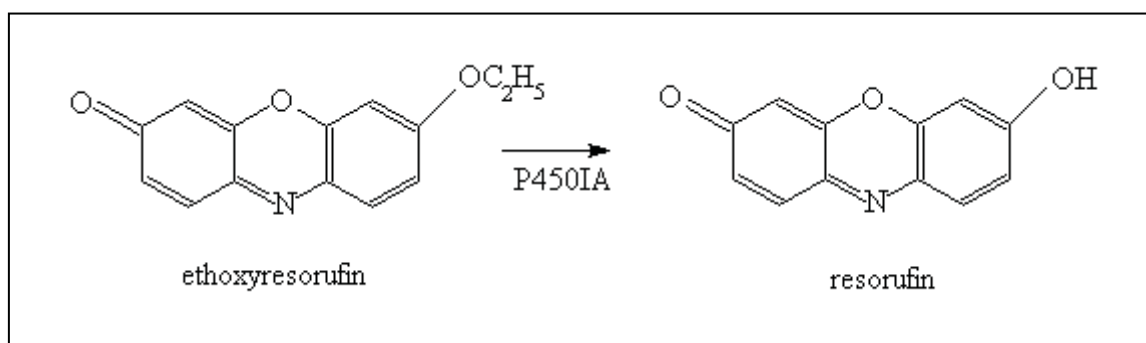


Figura 18: Reacción general del ensayo de actividad EROD.

Dado que el resorufin es un compuesto fluorescente, la cantidad producida en la reacción a partir de etoxiresorufin se puede medir directamente a través de la cantidad de fluorescencia emitida en su rango de absorbancia (excitación 535 nm, emisión 585 nm), y el incremento en la fluorescencia es directamente proporcional a la actividad de las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 (Figura 18).

Este ensayo se realizó utilizando extractos de proteínas microsomales. Las muestras se ensayaron por triplicado. Cada placa contenía una recta patrón de resorufin a diferentes concentraciones, por duplicado, así como un blanco por triplicado (Figura 19).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Patrón A	Patrón A	Patrón B	Patrón B	Patrón C	Patrón C	Patrón D	Patrón D	Patrón E	Patrón E	Patrón F	Patrón F
B	Patrón G	Patrón G	Patrón H	Patrón H	Patrón I	Patrón I	Patrón J	Patrón J	Patrón K	Patrón K	Patrón L	Patrón L
C	Blanco	Blanco	Blanco	1	1	1	2	2	2	3	3	3
D	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7
E	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11
F	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15
G	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19
H	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23

Figura 19: Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad EROD.

La recta patrón incluyó las siguientes concentraciones de resorufin (Sigma-Aldrich) diluidas en PBS 100mM pH 7.8: 0 (A), 0.05 (B), 0.25 (C), 0.5 (D), 0.75 (E), 1 (F), 1.25 (G), 1.50 (H), 1.75 (I), 2 (J), 2.25 (K) y 2.5 (L) μ M. Estas diluciones fueron preparadas a partir de una solución madre de resorufin 5 μ M. De cada una de las diluciones se añadieron 230 μ L en los pocillos correspondientes a la recta patrón. Las muestras problema fueron diluidas en PBS a una concentración final de 0.1 μ g/ μ L. De esta dilución se añadieron 173 μ L de cada muestra en los correspondientes pocillos (triplicados). Asimismo, para el control negativo o blanco se añadieron 173 μ L de PBS en cada uno de los pocillos del triplicado. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo plano y pared negra (Greiner Bio-One) adecuadas para ensayos de fluorescencia. Una vez añadidas las muestras, la recta patrón y el control negativo, la placa se mantuvo en hielo sobre papel de aluminio para conservar las muestras a +4°C.

A partir de una solución madre de etoxiresorufin (ERF) (Sigma-Aldrich) 1mM, sustrato de la reacción, se preparó, justo antes de su utilización, la solución de trabajo 40 μ M en PBS. Ambas soluciones se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a +4°C. Se añadieron 29 μ L de la solución de trabajo a todos los pocillos de la placa excepto a los de la recta patrón. Rápidamente, se introdujo la placa en el lector de placas *NanoQuant infinite M200*, previamente programado, y se incubó a +37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron a las muestras y al control negativo 28 μ L de una solución de NADPH (Sigma-Aldrich) 2 mM, previamente preparada y conservada a +4°C y en oscuridad. El volumen final de la reacción fue 230 μ L/pocillo. Tras añadir el NADPH, la placa fue devuelta al lector, se agitó y se midió la fluorescencia durante 10 minutos cada minuto a longitudes de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 585 nm. Con los datos de lectura obtenidos se estableció la cinética de la reacción de la siguiente forma:

1) La linealidad de la reacción fue determinada representando los valores de fluorescencia en función del tiempo.

2) Se restó el valor de fluorescencia a 585nm de cada minuto del blanco (*background*) a la correspondiente medida de fluorescencia a 585nm de cada muestra.

3) Se representó la recta patrón, concentración resorufin (μ M) vs fluorescencia, y se hicieron los cálculos de regresión lineal para obtener los valores de los coeficientes de Intercepción y Variable X (Pendiente) ($y = \text{Intercepción} + aX$; $y = aX + b$). A partir de los datos de la recta patrón se obtuvo, por regresión lineal, una función que permitió extrapolar la concentración de resorufin formado en cada punto de cada muestra problema: ($\mu\text{mol resorufin} = \text{Valor Fluorescencia} - b / ax$)

4) Una vez obtenidos los valores de concentración de resorufin para cada punto de la curva, se calculó la velocidad de formación de resorufin ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$), en el rango lineal de la función, para cada muestra:

$$\Delta\mu\text{mol} / \Delta\text{min} = \frac{\mu\text{mol}(\text{final}) - \mu\text{mol}(\text{inicial})}{\text{Tiempo de la reacción (min)}}$$

5) Finalmente la actividad específica EROD de cada muestra se expresó relativizada a la cantidad de proteína (mg) cargada por pocillo: ($\Delta\mu\text{mol} / \Delta\text{min} / \text{mg proteína} = \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$)

Los criterios establecidos para aceptar los resultados obtenidos o repetir la muestra fueron los siguientes:

- 1) El número de puntos de la región lineal de la gráfica representada para cada muestra debió de ser de al menos 6.
- 2) El coeficiente de variación de los valores de los triplicados para cada medida a lo largo del tiempo debió de ser inferior al 15%.
- 3) Se aceptaron valores de CV% por debajo del 20% si fue solamente un punto de la región lineal de la recta el que presentó este valor elevado.
- 4) Se repitió el ensayo para aquellas muestras que no cumplieron todos estos requisitos.

5.2. ACTIVIDAD NQO1.

El ensayo de actividad de NQO1 se basó en el protocolo de Prochaska HJ y Santamaria AB ([7924]) modificado para microplacas por Tan AS y Berridge MV ([7923]).

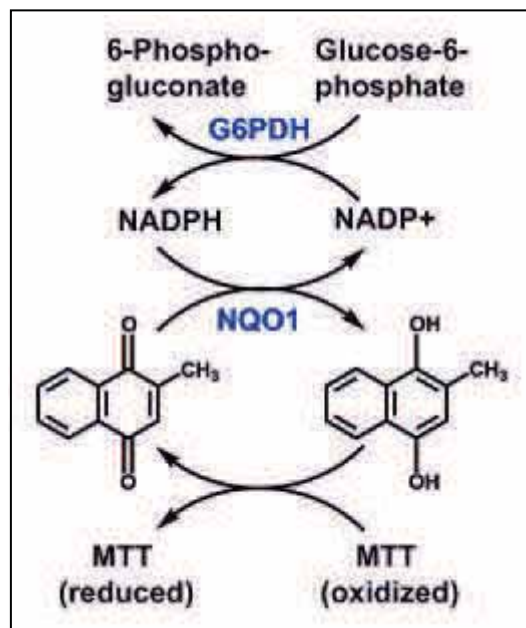


Figura 20: Reacción general del ensayo de actividad NQO1.

La reacción global del ensayo está acoplada a un sistema regenerador del NADP^+ basado en la actividad Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa. El menadiol formado a partir de

menadiona como consecuencia de la acción de NQO1, en una reacción no enzimática posterior, reduce el MTT oxidado (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), de color amarillo, hasta MTT reducido (Formazan), de color azul, cuya formación se mide a una longitud de onda de 570nm (Figura 20).

Para eliminar la posible inespecificidad del conjunto de la reacción se utilizó el compuesto dicumarol para inhibir la actividad de NQO1. Por lo tanto, para cada muestra se realizaron dos ensayos de actividad, uno sin dicumarol y otro con dicumarol. La actividad específica de NQO1 se calculó restando el valor de absorbancia de la reacción con dicumarol al valor de la misma reacción sin el inhibidor de la actividad de NQO1. La placa quedó dividida en dos partes: en una mitad las muestras (por duplicado) contenían todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción más dicumarol; en la otra mitad, las mismas muestras contenían los mismos componentes menos el inhibidor de la actividad de la enzima (Figura 21). El número máximo de muestras que se procesaron por placa fue de 23. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Fisher Scientific). Este ensayo fue realizado con muestras citosólicas hepáticas de la serie experimental 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C(-)	4.	8.	12.	16.	20.	C(-)	4.	8.	12.	16.	20.
B	C(-)	4.	8.	12.	16.	20.	C(-)	4.	8.	12.	16.	20.
C	1.	5.	9.	13.	17.	21.	1.	5.	9.	13.	17.	21.
D	1.	5.	9.	13.	17.	21.	1.	5.	9.	13.	17.	21.
E	2.	6.	10.	14.	18.	22.	2.	6.	10.	14.	18.	22.
F	2.	6.	10.	14.	18.	22.	2.	6.	10.	14.	18.	22.
G	3.	7.	11.	15.	19.	23.	3.	7.	11.	15.	19.	23.
H	3.	7.	11.	15.	19.	23.	3.	7.	11.	15.	19.	23.
	CON Dicoumarol						SIN Dicoumarol					

Figura 21. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad NQO1.

Se prepararon diluciones de los extractos proteicos a una concentración de 0.2 µg/µL en agua ultrapura y se mantuvieron a +4°C. Posteriormente, se cargaron 20 µL de muestra por pocillo de forma que la cantidad total de proteína fue de 4 µg/pocillo. A partir de soluciones madre preparadas con anterioridad y mantenidas a -20°C o +4°C, según las indicaciones de la casa comercial, antes de iniciar el ensayo se preparó una mezcla, en agua ultrapura, de Tris

HCl (Sigma-Aldrich) 25 mM; Tween 20 (Serva) 0.01% (v/v); FAD (Flavin Adenin Dinucleótido) (Sigma-Aldrich) 5 μ M; Glucosa-6-fosfato (Sigma-Aldrich) 1mM; NADPH (Sigma-Aldrich) 30 μ M; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Merck-Millipore) 2 U/mL; MTT (Sigma-Aldrich) 0.5 mg/mL; y dicumarol (Sigma-Aldrich) 5 μ M, en el caso de la solución correspondiente a las muestras inhibidas. Las soluciones recién preparadas se mantuvieron a +4°C y en oscuridad.

A continuación, se procedió a cargar la placa. Se añadieron 20 μ L de cada una de las muestras en los pocillos predeterminados, dos en los que se llevó a cabo la reacción completa y dos en los que ésta se inhibió con dicumarol. Se utilizaron dos controles negativos (C(-)), sin proteína, en los que se añadieron 20 μ L de H₂O ultrapura. Seguidamente, con la pipeta multicanal, se añadieron 160 μ L de las mezclas anteriormente preparadas, con y sin dicumarol. La placa se mantuvo en hielo. A continuación, se introdujo en el lector (*NanoQuant infinite M200*) y se inició el programa previamente diseñado. Cuando se alcanzaron los +37°C placa fue expulsada y se procedió a cargar en todos los pocillos 20 μ L de la solución de menadiona (Sigma-Aldrich) 150 μ M, de manera que su concentración final fue de 15 μ M. Se iniciaron las lecturas de absorbancia a 570 nm cada 2 minutos durante 20 minutos. La cinética de la reacción se calculó de la siguiente forma:

- 1) La linealidad de la reacción fue determinada representando los valores de absorbancia en función del tiempo.
- 2) A los valores de absorbancia de cada medida de las muestras sin dicumarol se restaron los valores correspondientes de la misma con el inhibidor. Se utilizaron estos valores para el resto de cálculos.
- 3) Se calculó el cambio en absorbancia (ΔA_{570})/minuto, en el rango lineal de la función, para cada muestra usando la siguiente ecuación:

$$(\Delta A_{570})/\text{min} = \frac{A_{570}(\text{final}) - A_{570}(\text{inicial})}{\text{Tiempo de la reacción (min)}}$$

- 4) La actividad específica de NQO1 se determinó con la siguiente ecuación:

$$\frac{(\Delta A_{570})/\text{min} \times V(\text{mL}) \times \text{dil}}{\epsilon \text{mM} \times V_{\text{enz}}(\text{mL})} = \mu\text{mol} / \text{mL} / \text{min}$$

donde:

dil = factor de dilución de la muestra original (μL de muestra original / volumen total de muestra cargado por pocillo (20 μL)).

ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = coeficiente de extinción del MTT a 570nm, 17 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Ajustado para ensayos en placas de 96 pocillos: 9.384 mM^{-1} (paso de luz $\sim 0.552\text{ cm}$)

V = volumen de reacción; para las placas de 96 pocillos, 0.2 mL.

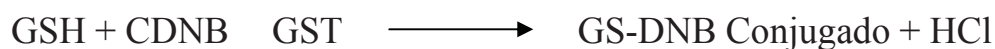
Venz = volumen de la muestra por pocillo, 20 μL .

Además, se aplicaron los mismos criterios utilizados en el ensayo de actividad EROD para aceptar los resultados obtenidos o repetir la muestra (véase apartado 5.1).

5.3. ACTIVIDAD GST.

La actividad enzimática de GST fue ensayada espectrofotométricamente basándose en el protocolo de Habig WH *et al.* ([6905]), y utilizando el *Glutathione-S-Transferase (GST) Assay Kit* de Sigma-Aldrich. Este ensayo fue realizado con muestras citosólicas hepáticas de la serie experimental 2. El número máximo de muestras que se procesaron por placa fue de 46. Las muestras fueron ensayadas por duplicado y cada placa contuvo un control negativo o blanco (B) y un control positivo (C(+)), también por duplicado (Figura 22). Se utilizaron microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Fisher Scientific).

El principio general del ensayo es el siguiente:



(GSH: L-glutathione reducido, CDNB: 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno, GST: Glutathione S- transferase).

El producto de la reacción, GS-DNB, absorbe a 340 nm de manera que la tasa de incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de GST en la muestra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	C (+)	C(+)	1	1	2	2	3	3	4	4
B	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10
C	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16
D	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22
E	23	23	24	24	25	25	26	26	27	27	28	28
F	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34
G	35	35	36	36	37	37	38	38	39	39	40	40
H	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46

Figura 22: Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad GST.

Las muestras fueron diluidas en *Sample Buffer* proporcionado por el kit, a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En cada pocillo se añadieron 20 μL de esta dilución y, por tanto, 10 μg de proteína total. En el caso del C(+), se preparó una dilución 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en *Sample Buffer* a partir de una solución madre de GST, 0.25 mg/mL, proporcionada por el kit. En cada pocillo se cargaron 20 μL . En el caso del blanco, solamente se añadieron 20 μL de *Sample Buffer* por pocillo. La solución de sustrato se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante. Así, su composición fue L-Glutation reducido 20 mM y CDNB 10 mM, sustrato de la reacción, en *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*. Esta solución se preparó como máximo 60 minutos antes de su utilización. Se añadieron 180 μL de esta solución de sustrato en todos los pocillos de la placa, incluyendo el C(+) y el blanco. El volumen final de reacción fue de 200 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$.

Una vez preparada la placa se introdujo rápidamente en el lector (*NanoQuant infinite M200*) y se inició el programa previamente diseñado. Se realizaron lecturas de absorbancia a 340 nm cada minuto durante 10 minutos a temperatura ambiente. La cinética de la reacción se calculó de la siguiente forma:

1) La linealidad de la reacción fue determinada representando los valores de absorbancia en función del tiempo.

2) Se restó el valor de absorbancia a 340 nm de cada minuto del blanco (*background*) a la correspondiente medida de absorbancia a 340 nm de cada muestra.

3) Se calculó el cambio en absorbancia (ΔA_{340})/minuto, en el rango lineal de la función, para cada muestra usando la siguiente ecuación:

$$(\Delta A_{340})/\text{min} = \frac{A_{340}(\text{final}) - A_{340}(\text{inicial})}{\text{Tiempo de la reacción (min)}}$$

4) La actividad específica de GST se determinó con la siguiente ecuación:

$$\frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V(\text{mL}) \times \text{dil}}{\text{emM} \times V_{\text{enz}}(\text{mL})} = \mu\text{mol} / \text{mL} / \text{min}$$

donde:

dil = factor de dilución de la muestra original (μL de muestra original / volumen total de muestra cargado por pocillo (20 μL)).

emM ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = coeficiente de extinción del CDNB conjugado a 340nm. Para ensayos en placas de 96 pocillos: 5.3 mM^{-1} (paso de luz $\sim 0.552 \text{ cm}$)

V = volumen de reacción; para placas de 96 pocillos, 0.2 mL.

V_{enz} = volumen de la muestra cargada por pocillo, 20 μL .

Además, se aplicaron los mismos criterios utilizados en los ensayo de actividad EROD y NQO1 para aceptar los resultados obtenidos o repetir la muestra (véase apartado 5.1).

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Con el fin de determinar el grado de retención en el citoplasma de los principales factores de transcripción que modulan la expresión de los XMEs estudiados en este trabajo (forma inactiva) se utilizó la técnica de inmunoprecipitación. Para ello se utilizaron los extractos citosólicos de las muestras hepáticas de todos los sacrificios y grupos de la serie experimental 1, y las muestras pertenecientes a los sacrificios 52, 53.5, 54, 55, 58 y 63 de los

grupos de animales inducidos ($2C_i$, $2M_i$ y $2O_i$) de la serie experimental 2. Debido a que tras la realización de la técnica en la primera serie experimental y su posterior utilización en la siguiente algunos instrumentos y sistemas del laboratorio fueron actualizados, el protocolo presentó algunos cambios entre una serie y otra. Éstos se irán detallando a continuación.

El protocolo de inmunoprecipitación se basó en el sistema *Pure Proteome Protein G Magnetic Beads* y *Pure Proteome Protein A Magnetic Beads* (Millipore). Brevemente, 50 μL de *Pure Proteome Protein G Magnetic Beads* para la inmunoprecipitación de AhR y de *Pure Proteome Protein A Magnetic Beads* para Nrf2 fueron añadidos a un tubo eppendorf y lavadas con 500 μL de PBS conteniendo Tween-20 0.1% (PBS-T) mediante agitación vigorosa en vortex durante 10 segundos. El PBS-T fue retirado con una pipeta tras colocar el eppendorf en el *Magna GrIP Rack* (Millipore), soporte magnético que atrae las *Magnetic Beads* hacia las paredes facilitando la eliminación de soluciones del tubo. Posteriormente, se resuspendieron las “beads” en 100 μL de PBS-T y se añadió la solución de anticuerpo, 1 μL de anti-AhR (Abcam) y 5 μL de anti-Nrf2 (Santa Cruz). Las *beads* y la solución de anticuerpo se incubaron en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se retiró la solución y se realizaron tres lavados con PBS-T. Mientras tanto, se prepararon las adecuadas diluciones de las muestras problema a una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS-T y se añadieron al tubo conteniendo las *beads*. Se utilizaron 200 μL de solución de proteína en la serie experimental 1 y 300 μL en la serie experimental 2. Para facilitar la formación del complejo beads-anticuerpo-proteína específica las muestras se incubaron durante 16 horas (toda la noche) a $+4^\circ\text{C}$ y en agitación. Posteriormente, los tubos *eppendorf* se colocaron en el rack magnético, se retiró la solución de proteínas y se realizaron 3 lavados con PBS-T. Finalmente, para separar las *beads* de las proteínas inmunoprecipitadas, se añadieron 60 μL de una solución de agua *milli-Q:Laemli Buffer* (1:1) conteniendo un 5% de β -mercaptoetanol. Se incubó a $+90^\circ\text{C}$ durante 10 minutos en un baño, se colocaron los tubos en el rack magnético, y se recuperó el sobrenadante descartando las *beads* magnéticas.

De esta solución de proteínas inmunoprecipitadas se cargaron 20 μL de cada muestra en un gel SDS-PAGE y se realizó Western-Blot para determinar los niveles de la proteína de unión en el citoplasma específica de cada factor de transcripción inmunoprecipitado, Hsp90 para AhR y Keap1 para Nrf2. Las muestras pertenecientes a la serie experimental 1 fueron procesadas según el protocolo de Western-Blot anteriormente descrito, con las siguientes

diluciones de anticuerpos: anti-Hsp90 (Sigma-Aldrich) 1:2000 y anti-ratón 1:10000; anti-Keap1 (Santa Cruz) 1:2000 y anti-conejo 1:10000.

Por otro lado, las muestras de la serie experimental 2 fueron analizadas mediante sistemas comerciales que permiten la electroforesis y transferencia rápidas (BioRad). La electroforesis se realizó en *Mini-Protean® TGX Stain-Free™ Precast Gels*, durante 40 minutos a 200 V y temperatura ambiente. La transferencia a la membrana de PVDF fue realizada usando el *Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack* mediante el *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* durante 10 minutos a 2.5V y 1.3 mA. Los procesos de bloqueo, incubaciones de la membrana con las soluciones de anticuerpo y los respectivos lavados fueron realizados según lo anteriormente descrito. En este caso las diluciones de anticuerpo fueron las siguientes: Hsp90 (Sigma-Aldrich) 1:2,000 y anti-ratón 1:10,000; anti-Keap1 (Santa Cruz) 1:1,000 y anti-cabra 1:6,000. Finalmente, las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia, mediante el sistema *Clarity™ Western ECL Substrate* (BioRad) en el caso del revelado de Hsp90 y el sistema *Luminata™ Forte Western HRP Substrate* (Millipore) en el caso del revelado de Keap1. La fluorescencia fue analizada con el sistema *ChemiDoc™ XRS+* acoplado al programa informático *Image Lab™ Software* version 5.1 (BioRad). El contenido proteico se determinó mediante el sistema *Image Lab™ Software* y los valores fueron relativizados a la cantidad real de proteína en cada pocillo determinada gracias al sistema de los geles *TGX Stain-Free™*.

7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE METABOLITOS DEL DMBA. CROMATOGRAFÍA DE GASES/ ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).

MATERIAL:

- Ácido acético (Sigma-Aldrich, Química, S.A.).
- Acetato sódico (Sigma-Aldrich, Química, S.A.).
- *β-glucuronidasa from Helix Pomatia* (Sigma-Aldrich, Química, S.A.).
- *Sulfatasa from Helix Pomatia* (Sigma-Aldrich, Química, S.A.).
- Acetato de etilo (Merck-Millipore).
- Ácido clorídrico 0,1M (Fluka).
- HDMS (hexametildisilazano) + TMCS (trimetilclorosilano) + Pyridine (3:1:9) Sylon HTP Kit (Supelco).

PATRONES:

- 7,12-Dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA) (Supelco).
- 3-Hidroxi-7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (3-OH-DMBA) (MRIGlobal).
- 7,12-Dimetilbenzo(a)antraceno-trans-3,4-dihidrodiol (3,4-diOH-DMBA) (MRIGlobal).
- 7-Hidroximetil-12-metilbenzo(a)antraceno (7-OH-Me-12-MBA) (MRIGlobal).
- 12-Hidroximetil-7-metilbenzo(a)antraceno (12-OH-Me-7-MBA) (MRIGlobal).

EQUIPOS:

- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas. *Shimadzu* QP2010
- Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m d.f) (Agilent Technologies).

La técnica de detección mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (GC/MS) fue realizada en colaboración con la Unidad de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas Aplicada, Centros Científicos y Tecnológicos, Universidad de Barcelona (UB).

Las muestras de plasma obtenidas durante los sacrificios de los animales fueron conservadas a -80°C y protegidas de la luz desde su extracción hasta su utilización. De cada grupo experimental de animales inducidos (2C_i , 2M_i y 2O_i) se utilizaron dos muestras de 52 d.e. (24 horas pre-inducción) utilizadas como controles negativos, y cinco muestras de las edades 53.5, 54, 55 y 58 d.e., correspondientes a las 12, 24, 48 y 120 horas post-inducción.

Antes de ser introducidas en el aparato de GC/MS las muestras fueron preparadas como se describe a continuación:

Hidrólisis enzimática:

En un tubo de centrifuga de 10 mL, se colocaron 300 μ L de plasma. Se añadió 1 mL de ácido acético/acetato sódico 0,4 M a pH 5, 2000 unidades de β -glucuronidasa y 50 unidades de sulfatasa. La hidrólisis enzimática se realizó a $+40^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. De esta forma se consiguió la liberación de los metabolitos que podrían estar sulfatados o glucuronizados. Los metabolitos libres y el DMBA se extrajeron con 3x1 mL de acetato de etilo.

Hidrólisis ácida:

Los conjugados con glutatión, que quedaron en la fase acuosa tras la primera hidrólisis, se hidrolizaron con ácido clorhídrico 0,1M hasta pH 1,0 y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Se extrajeron con acetato de etilo 3 veces.

Los extractos de las dos hidrólisis se combinaron y evaporaron hasta 100 µL con nitrógeno.

Derivatización

Las muestras fueron después derivatizadas con 100 µL de HMDS+TMCS+Pyridine 3:1:9 durante 20 minutos a +60°C, para facilitar la volatilización de los diferentes compuestos.

Posteriormente se realizó la determinación por GC/MS bajo las siguientes condiciones:

- Programa de temperaturas: +50° C (1 min), aumento de 15 °C/min hasta +120 °C y de +6°C/min hasta +315 °C (10min)
- Temperatura del inyector: +280 °C
- Modo de inyección: splitless
- Tiempos de *splitless* o de permanencia: 1min
- Flujo de *split*: 20 mL/min
- Gas portador: Helio
- Flujo de gas portador: 1 mL/min
- Temperatura del detector: +280 °C
- Temperatura de la fuente de iones: +200 °C
- Tiempo de espera del solvente (*Solvent delay*): 10 min
- *Detector Gain*: 1,5 kV
- Modo SIM (*Selected Ion Monitoring*):

<u>Compuesto</u>	<u>m/z</u> (relación masa/carga):
DMBA	256 (100) 241 (75)
3-OH-DMBA	344 (100) 329 (80)
3,4-diOH-DMBA	376 (100) 434 (25)
7-OH-Me-12-MBA	344 (100) 329 (80)
12-OH-Me-7-MBA	344 (90) 329 (100)

A partir de los perfiles cromatográficos de los patrones de los metabolitos de interés (Figura 23) y por comparación con las muestras analizadas (Figura 24), se obtuvieron las

concentraciones de DMBA y de los metabolitos 3-OH-DMBA, 3,4-diOH-DMBA, 7-OH-Me-12-MBA y 12-OH-Me-7-MBA en las diferentes muestras de plasma.

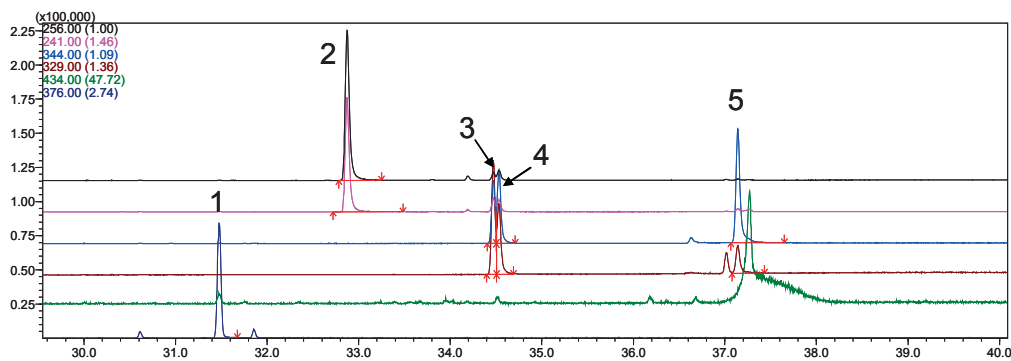


Figura 23: Cromatograma de los patrones de DMBA y sus metabolitos. 1. 3,4-diOH-DMBA; 2. DMBA; 3. 7-OH-Me-12-MBA; 4. 3-OH-DMBA; 5. 12-OH-Me-7-MBA.

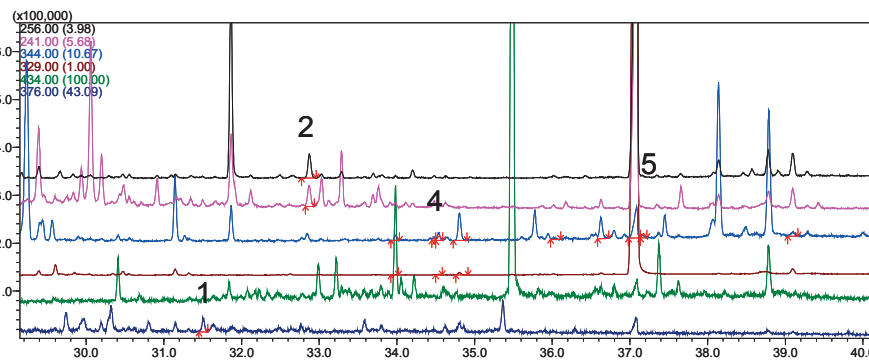


Figura 24: Imagen representativa de un cromatograma modelo de las muestras de plasma. 1. 3,4-diOH-DMBA; 2. DMBA; 3. 7-OH-Me-12-MBA; 4. 3-OH-DMBA; 5. 12-OH-Me-7-MBA.

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Dado que los datos de cáncer no siguen una distribución normal y las varianzas son heterogéneas, se aplicó una estadística no paramétrica en todo el estudio para dar homogeneidad a los análisis estadísticos. Se utilizó el software PAW Statistics 20 (antes SPSS). El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

1.1. CARCINOGENÉISIS.

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

Datos cualitativos.

Estudio temporal: Comparación entre curvas mediante el análisis de la varianza no paramétrico de 2 factores -test de Friedman-.

Sacrificio: Prueba de la ji-cuadrado (χ^2). Los tratamientos con dos caracteres fueron de dos tipos: comparación de frecuencias observadas, y comparación de reparticiones observadas frente a reparticiones teóricas dadas por la hipótesis nula de equiprobabilidad. En el caso de más de dos caracteres, la estrategia del tratamiento se basó en el análisis de relación de todos ellos ([1674]). Se aplicaron sistemáticamente los criterios de Lewontin y Felsenstein para las frecuencias calculadas de todas las tablas 2xN.

Datos cuantitativos.

Estudio temporal: la comparación entre curvas de los parámetros de la carcinogénesis se realizó mediante el el análisis de la varianza no paramétrico de 2 factores -test de Friedman-.

Sacrificio: Prueba no paramétrica de la U de Mann-Withney para la comparación de 2 poblaciones y test no paramétrico de Kruskal-Wallis para varias poblaciones.

1.2. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y LA MASA CORPORAL.

Datos cuantitativos.

Para el análisis de la evolución ponderal se utilizó el test estadístico de Modelos No lineales Mixtos ([3935]) para ajustar los datos de cada grupo a una función de regresión asintótica. Se realizó una estimación del peso corporal diario de los animales mediante una regresión lineal para predecir los valores que faltaban. Los datos del peso e índices de masa

corporal de los animales en momentos determinados del ensayo (sacrificios) se analizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney.

2. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Datos cualitativos.

Se utilizó la prueba de la ji-cuadrado (χ^2) para analizar los datos obtenidos del estudio histopatológico de los adenocarcinomas mamarios.

Datos cuantitativos.

El análisis del daño en el ADN de la glándula mamaria a través de la detección de los aductos DMBA-ADN se analizó mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney.

3. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Datos cuantitativos.

Los resultados fueron analizados mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney en el caso de las comparaciones dos a dos y mediante el test no paramétrico de Friedman en las comparaciones de resultados globales a lo largo del tiempo.



RESULTADOS

A. ONTOGENIA DE LAS PRINCIPALES XMEs EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA EN LA RATA SPRAGUE-DAWLEY.

Con el fin de estudiar la ontogenia de las principales enzimas implicadas en el metabolismo del DMBA y comparar el efecto de las distintas dietas experimentales (objetivo 1), se procedió al estudio de la expresión de ARNm y de los niveles de proteína de las enzimas de fase I CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, y de las de fase II GSTP1 y NQO1. El trabajo se realizó en hígado, el principal órgano metabolizador, y en glándula mamaria, el tejido diana del carcinógeno. Este primer objetivo del trabajo se desarrolló con las muestras procedentes de la serie experimental 1.

1. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA.

En relación a las XMEs de fase I, CYP1A2 fue la enzima con mayores niveles de expresión de ARNm en hígado comparado con los otros CYP1s. Así, la expresión de CYP1A2 fue del orden de 100 veces superior a la de CYP1A1, la siguiente enzima de fase I más expresada en este tejido (Tabla 8). CYP1B1 fue la enzima menos expresada de los tres CYP1s, con valores entre 1.4 y 27 veces por debajo de CYP1A1 (Tabla 8). Todas las diferencias entre la expresión de CYP1A2 y la de los otros CYP1s (CYP1A1 y CYP1B1) fueron estadísticamente significativas para todas las edades y grupos experimentales. En el caso de las comparaciones entre CYP1A1 y CYP1B1, todas las diferencias fueron significativas con la excepción del grupo $1C_i$ a 51 días de edad (d.e.) (Tabla 9).

En glándula mamaria no se detectó expresión de CYP1A2, y CYP1B1 se expresó entre 2 y 80 veces más que CYP1A1 (Tabla 8). Todas las comparaciones entre estas dos enzimas fueron estadísticamente significativas excepto en el grupo $1M_i$ a 36 d.e. (Tabla 9).

Al comparar la expresión de CYP1A1 y CYP1B1 entre los dos tejidos estudiados, hígado vs glándula mamaria, se observó que los niveles de ARNm de CYP1A1 fueron del orden de 80 veces superiores en el hígado respecto a la glándula a 24 d.e. y que estas diferencias fueron disminuyendo a lo largo del tiempo. Así, a 36 d.e. la expresión hepática fue entre 1.5 y 4 veces superior a la de glándula, se alcanzaron unos niveles similares en ambos tejidos en todos los grupos a 51 d.e., y a 100 d.e. la expresión en hígado fue ligeramente superior a la de glándula en los grupos $1C_i$ y $1M_i$ (Tabla 8). Las diferencias observadas a 24,

36 y 100 d.e. fueron significativas en todos los grupos experimentales excepto en el $1M_i$ a 36 d.e. (Tabla 10). En el caso de CYP1B1, la expresión de ARNm en glándula presentó valores entre 5 y 70 veces superiores a los de hígado para todos los grupos y edades estudiadas (Tabla 8), siendo todas las diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10).

En relación a la expresión de las XMEs de fase II, el número de diferencias halladas fue menor que en el caso de las enzimas de fase I. Se pudo determinar que NQO1 presentó niveles de expresión de ARNm en hígado del orden de 3 a 4 veces superiores a los de GSTP1 (Tabla 8). Estas diferencias fueron significativas en todos los grupos experimentales salvo en $1O_i$ a 36 d.e. y en $1M_i$ a 51 d.e. (Tabla 9).

Por el contrario, en glándula mamaria, la enzima GSTP1 presentó niveles de expresión superiores (entre 1.3 y 2-4 veces) a los de NQO1 (Tabla 8), siendo las diferencias significativas en todos los casos excepto en el grupo $1M_i$ a 36 d.e. (Tabla 9).

La comparación de los niveles de ARNm de NQO1 y GSTP1 entre los dos tejidos estudiados mostró que la expresión de GSTP1 era similar en ambos tejidos en todos los grupos experimentales, a excepción del grupo $1C_i$ a 100 d.e. (Tabla 24), donde la expresión en glándula fue dos veces superior a la hepática ($p \leq 0.05$) (Tabla 10). En el caso de NQO1, los niveles de ARNm en hígado fueron siempre superiores a los de glándula (del orden de 2 a 8 veces) (Tabla 24). En este caso, todas las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 10).

Tabla 8. Patrón de expresión de las XMEs de fase I y fase II en hígado y glándula mamaria.

d.e.	Grupo	Hígado															
		CYP1A2			CYP1A1			CYP1B1			GSTP1			NQO1			
		ARNm	Prot.	ARNm	Prot.	ARNm	Prot.	ARNm	Prot.	ARNm	Prot.	ARNm	Prot.	ARNm	Prot.	ARNm	Prot.
24	n	27.03	15.6	133.02	20.2	0.34	0.67	459.60	154.2	0.013	0.004	342.31	73.62	6.36	9.73	22.70	7.71
	M ± DE	20.04	135.5	0.073	428.68	0.012	350.5	1.522	23.47	2.49	7.28	7.44	4.55	1.032	21.92	21.32	186.59 ± 111.27
	m	14.52	50.06	106.11	154.08	0.06	1.32	325.19	674.90	0.009	0.0018	292.43	422.77	0.45	21.07	12.53	31.45
36	n	46.92	19.49	124.80	25.92	0.21	0.16	102.59	55.74	0.006	0.001	218.77	75.15	1.49	1.22	49.36	7.70
	M ± DE	42.64	134.4	0.115	78.64	0.006	159.9	32.32	4.14	3.12	3.43	1.70	3.12	0.865	32.32	1.16	82.99 ± 61.17
	m	23.08	80.04	121.36	189.18	0.03	0.39	52.02	227.42	0.004	0.009	28.58	263.10	0.27	5.20	27.76	52.78
51	n	44.77	10.20	117.07	21.14	0.071	0.011	50.96	18.29	0.008	0.004	210.19	173.19	3.38	3.19	31.67	11.77
	M ± DE	41.51	114.1	0.088	41.58	0.007	298.2	30.53	3.38	1.33	1.47	0.84	4.82	2.398	46.99	1.33	61.28 ± 58.66
	m	34.29	58.11	95.89	145.70	0.08	0.09	36.63	76.78	0.005	0.015	1.34	393.71	0.54	7.71	17.19	45.05
100	n	24.86	4.63	140.14	20.45	0.013	0.019	17.91	3.62	0.005	0.003	190.60	130.83	0.89	0.31	22.66	8.91
	M ± DE	22.92	142.4	0.007	18.55	0.005	220.6	28.58	3.81	1.74	1.97	1.10	0.925	26.58	0.924	6.35	135.8
	m	20.61	31.36	116.10	165.44	0.002	0.041	13.73	22.34	0.003	0.009	38.19	343.32	0.48	1.26	10.95	31.21
24	n	43.24	8.28	135.70	17.52	0.023	0.023	27.88	16.82	0.004	0.001	204.57	129.07	1.27	1.34	27.61	5.87
	M ± DE	41.51	137.5	0.014	22.29	0.004	179.8	29.32	1.25	1.50	2.20	1.26	0.745	19.68	1.154	20.80	101.51 ± 116.19
	m	34.92	54.84	112.44	156.00	0.011	0.056	12.17	51.15	0.004	0.006	83.70	386.77	0.46	3.26	20.41	33.64
36	n	34.15	6.63	121.92	8.77	0.009	0.006	25.24	11.87	0.004	0.002	257.20	117.58	0.84	0.72	20.10	12.41
	M ± DE	34.14	123.8	0.007	25.19	0.004	269.0	19.68	2.30	2.99	3.03	1.76	0.576	19.68	1.010	20.27	15.165 ± 94.96
	m	26.96	41.73	110.55	130.92	0.004	0.017	11.96	38.25	0.002	0.006	117.73	396.40	0.40	1.91	5.63	33.53
51	n	28.30	7.01	105.46	9.46	0.009	0.003	26.18	11.79	0.002	0.001	161.77	193.60	0.57	0.13	32.01	11.68
	M ± DE	25.75	106.8	0.008	26.61	0.002	120.3	33.89	1.91	40.92	50.80 ± 28.83	2.57 ± 1.09	0.625	33.89	2.39	0.81	45.25 ± 11.12
	m	20.94	36.01	93.39	115.04	0.006	0.013	11.69	39.82	0.001	0.003	13.46	423.32	0.44	0.74	17.01	42.82
100	n	61.50	21.38	104.58	7.15	0.025	0.030	56.65	53.70	0.002	0.001	80.38	107.28	0.70	0.16	39.71	11.57
	M ± DE	57.48	103.5	0.016	36.53	0.002	19.7	43.47	2.11	40.37	45.25 ± 11.12	2.57 ± 1.09	0.625	43.47	2.39	0.81	45.25 ± 11.12
	m	38.99	86.83	97.45	113.65	0.006	0.066	22.72	132.65	0.002	0.003	2.66	224.77	0.55	0.92	24.08	48.08
24	n	31.34	8.45	118.06	11.52	0.010	0.006	22.33	8.50	0.002	0.001	115.84	96.12	0.98	0.23	40.74	4.96
	M ± DE	32.76	116.5	0.011	21.83	0.002	85.4	41.42	2.34	64.95	64.83 ± 28.90	2.57 ± 1.09	0.912	41.42	2.34	64.95	445.8
	m	21.47	41.02	107.69	133.22	0.004	0.016	12.82	32.62	0.001	0.003	34.17	242.62	0.72	1.26	34.08	44.58

d.e.: días de edad; ₁C_i: grupo control inducido de la serie experimental I; ₁M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental I; ₁O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental I; n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; m: mediana; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; Prot.: proteína.

Tabla 9. Análisis estadístico de la expresión de ARNm de las XMEs en hígado y en glándula mamaria.

d.e.	Grupo	Hígado				Glándula mamaria	
		CYP1A2 vs CYP1A1	CYP1A2 vs CYP1B1	CYP1A1 vs CYP1B1	GSTP1 vs NQO1	CYP1A1 vs CYP1B1	GSTP1 vs NQO1
24		p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
36	₁ C _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	₁ M _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	--
	₁ O _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
51	₁ C _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	₁ M _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	₁ O _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
100	₁ C _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	₁ M _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	₁ O _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05

d.e.: días de edad.;₁C_i: grupo control inducido de la serie experimental 1; ₁M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; ₁O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; p≤0,05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Tabla 10. Análisis estadístico de la expresión de ARNm de las XMEs entre tejidos.

d.e.	Grupo	CYP1A1	CYP1B1	GSTP1	NQO1
		Hígado vs G.M.	Hígado vs G.M.	Hígado vs G.M.	Hígado vs G.M.
24		p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
36	₁ C _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
	₁ M _i	--	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
	₁ O _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
51	₁ C _i	--	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
	₁ M _i	--	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
	₁ O _i	--	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
100	₁ C _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05
	₁ M _i	p ≤ 0,05	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05
	₁ O _i	--	p ≤ 0,05	--	p ≤ 0,05

d.e.: días de edad.;₁C_i: grupo control inducido de la serie experimental 1; ₁M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; ₁O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; p≤0,05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

2. EFECTOS DE LA EDAD SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN HÍGADO.

El análisis de los cambios en la expresión hepática de las XMEs a lo largo del tiempo mostró una marcada tendencia general a la disminución tanto de los niveles de ARNm como de los de proteína en hígado de CYP1A1 y CYP1B1 entre los 24 y 100 d.e. A pesar de que los niveles de ARNm de CYP1A1 en los grupos ₁C_i y ₁M_i aumentaron entre 24 y 36 d.e., este aumento no fue significativo y no se correlacionó con los niveles de proteína (Figura 25.A. y Figura 25.B.). En el caso de CYP1A2 no se observó una tendencia clara de los niveles de ARNm ni de proteína a lo largo del tiempo. Aunque entre los 24 y 36 d.e. se produjo un

aumento de la expresión de ARNm en todos los grupos, éste no fue estadísticamente significativo. Además, después de este aumento los niveles de ARNm volvieron a una situación similar a la de los 24 d.e. en los grupos $1C_i$ y $1O_i$, mientras que se mantuvieron elevados en el grupo $1M_i$ (Figura 25.A.). Los niveles de proteína de CYP1A2 fueron estables a lo largo del tiempo en el caso del grupo $1O_i$, mientras que en $1C_i$ y $1M_i$ disminuyeron a 100 d.e. en comparación con el resto de edades (Figura 25.B.).

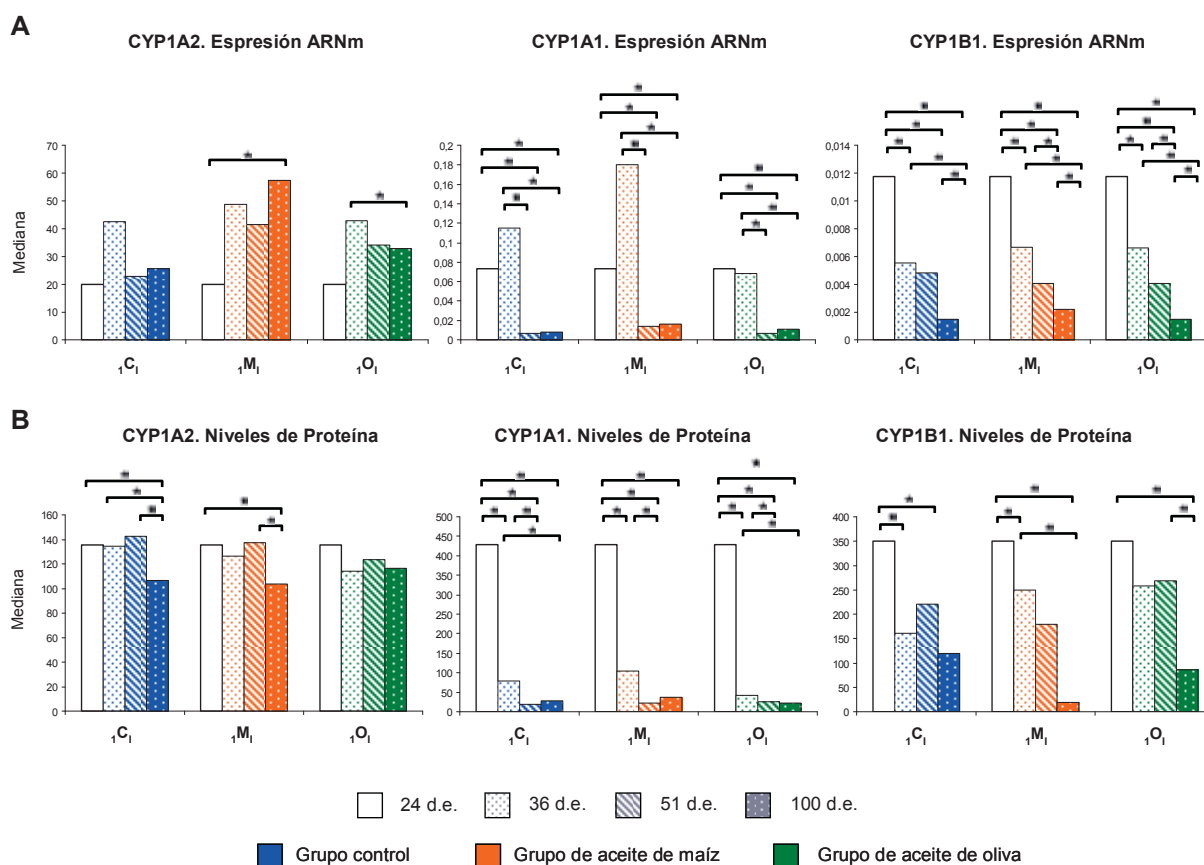


Figura 25. Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase I en hígado. A. Expresión de ARNm. B. Niveles de proteína. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

La disminución de la expresión hepática de CYP1A1 y CYP1B1 estuvo acompañada por un aumento de la retención citoplasmática del factor de transcripción AhR, de forma estadísticamente significativa a 100 d.e. en todos los grupos experimentales. Cuando se analizó si estos cambios en el grado de activación de dicho factor se acompañaba además de modificaciones en su expresión, los resultados mostraron un aumento de los niveles de

proteína ente 36 y 51 y 100 d.e., así como niveles estables del ARNm en todos los grupos (excepto en $1C_i$ donde disminuyó a 100 d.e.) (Figura 26).

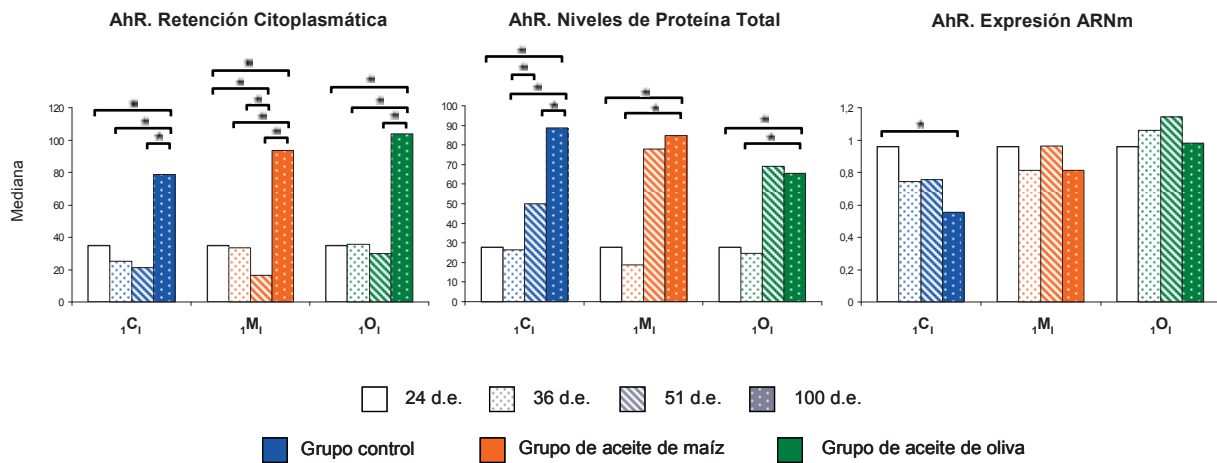


Figura 26. Efecto de la edad sobre la expresión hepática de las XMEs de fase I a través de la modulación de AhR. La retención citoplasmática de AhR se determinó a través de la medida de los niveles de AhR unido a Hsp90. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En cuanto a la expresión de ARNm en hígado de las XMEs de fase II, las diferencias encontradas entre las distintas edades y grupos experimentales fueron menores que para las enzimas de fase I. Así, se observó una ligera tendencia a la disminución a lo largo del tiempo en el caso de GSTP1, especialmente en los grupos $1C_i$ y $1M_i$, aunque no fue estadísticamente significativa (Figura 27.A.). En el caso de NQO1 sólo se obtuvo significación estadística en el descenso observado entre los 36 y 51 d.e. en el grupo $1M_i$. En el resto de grupos esta disminución también se pudo observar aunque de forma menos marcada y no significativa (Figura 27.A.). Con respecto a los niveles de proteína, se produjo un importante aumento de NQO1 a 100 d.e. en todos los grupos (Figura 27.B.). En el caso de GSTP1 los niveles de proteína fueron más variables a lo largo del tiempo, presentando un aumento en todos los grupos a 36 d.e., una disminución a 51 d.e. y un nuevo aumento a 100 d.e. Estos cambios fueron significativos en todos los grupos excepto en el grupo $1O_i$ a 36 d.e. (Figura 27.B.).

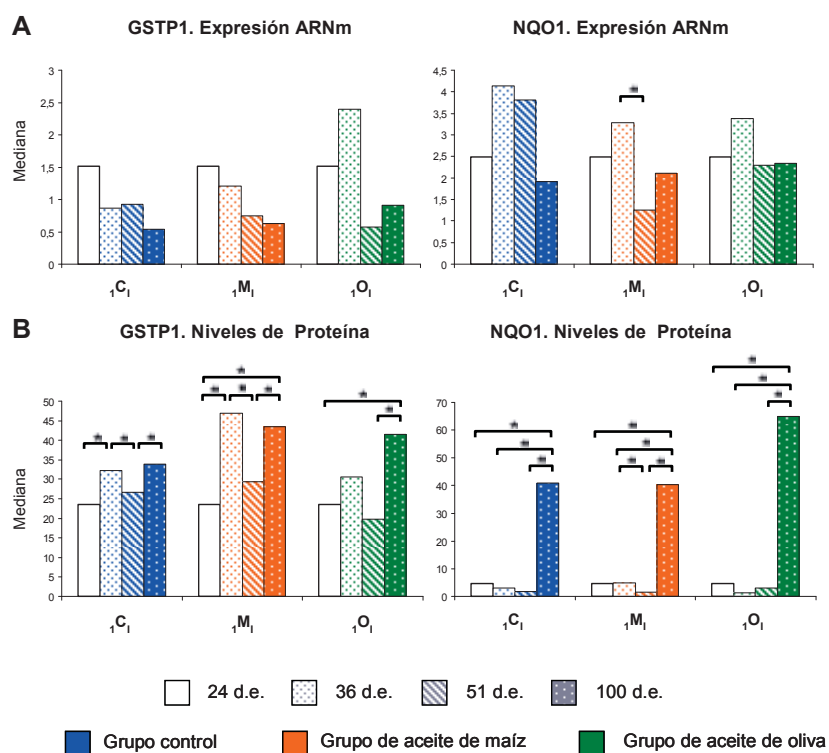


Figura 27. Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en hígado. A. Expresión de ARNm. **B.** Niveles de proteína. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Al analizar el papel del factor de transcripción Nrf2 en los cambios observados con la edad en la expresión de las XMEs de fase II, los resultados revelaron un aumento significativo de la retención en el citoplasma de dicho factor en los grupos $1C_i$ y $1M_i$ a 100 d.e. En el grupo $1O_i$, en cambio, a esta edad se produjo una disminución de los niveles de Nrf2 en citoplasma. Por otra parte, los niveles de proteína disminuyeron progresivamente a lo largo del tiempo en todos los grupos, siendo las diferencias estadísticamente significativas en los grupos $1C_i$ y $1M_i$ (Figura 28). En general estos resultados estarían en consonancia con la tendencia a la disminución de los niveles de ARNm de las enzimas de fase II, especialmente observada en GSTP1 (Figura 27.A.). Paradójicamente, los niveles de ARNm de Nrf2 aumentaron significativamente a 36, 51 y 100 d.e. en comparación con los de 24 d.e. en todos los grupos (Figura 28).

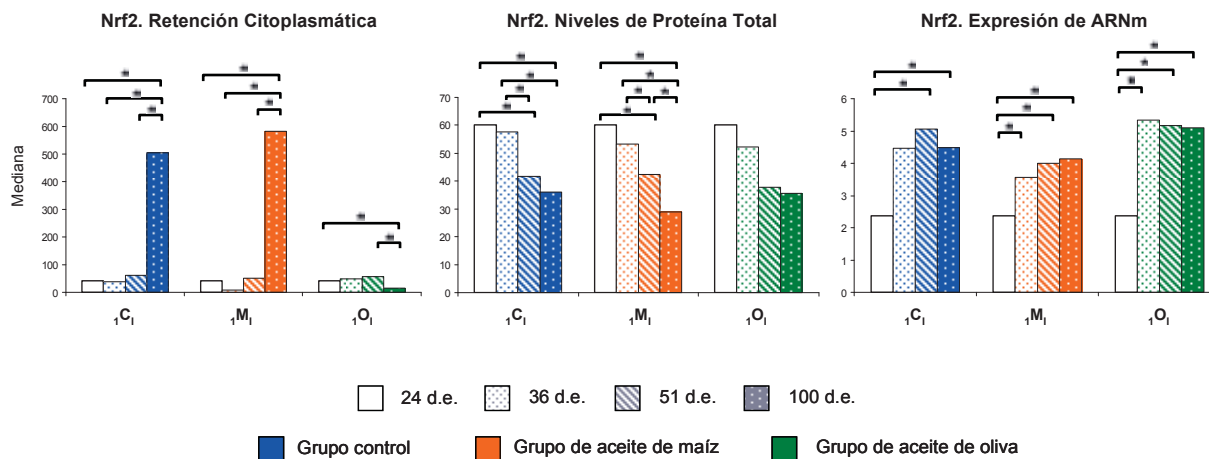


Figura 28. Efecto de la edad sobre la expresión hepática de las XMEs de fase II a través de la modulación de Nrf2. La retención citoplasmática de Nrf2 se determinó a través de los niveles de Nrf2 unido a Keap1. d.e.: días de edad; $1C_1$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_1$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_1$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Con el objetivo de clarificar el efecto general de la edad sobre la expresión de las XMEs en hígado, se calculó una ratio entre el sumatorio de los niveles de ARNm de los enzimas de fase I (CYP1A2, CYP1A1 y CYP1B1) y el sumatorio de los niveles de ARNm de las enzimas de fase II (GSTP1 y NQO1) (Figura 29.A.). Los resultados mostraron que mientras que en los grupos $1C_1$ y, principalmente, $1O_1$ los valores de esta ratio no se modificaban a lo largo del tiempo, en el grupo $1M_1$ esta ratio aumentó paulatinamente.

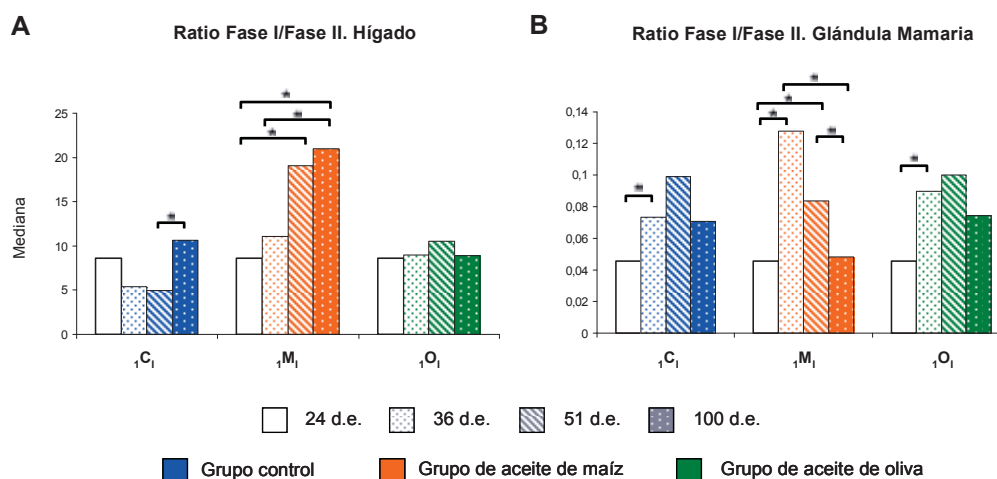


Figura 29. Balance del efecto de la edad sobre la expresión de las XMEs de fase I y fase II. Para cada animal se realizó por separado la suma de la expresión de las enzimas de fase I y las de fase II; ambos valores se dividieron entre sí y con los valores individuales que resultaron se calculó la mediana de cada grupo y se realizó el estudio estadístico. (A) Resultados en hígado (B) Resultados en glándula mamaria. d.e.: días de edad; $1C_1$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_1$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_1$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

3. EFECTOS DE LA EDAD SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN GLÁNDULA MAMARIA.

En relación a las enzimas de fase I, en todos los grupos experimentales los niveles de ARNm de CYP1A1 sufrieron un importante aumento a 36 d.e. en comparación con la expresión a 24 d.e., para posteriormente volver a una situación similar a la inicial, de forma más rápida en los grupos $1C_i$ y $1O_i$ y más lentamente en el grupo $1M_i$ (Figura 30). La expresión de ARNm de CYP1B1 presentó un patrón similar aunque con variaciones menos importantes. Así, el pico de mayor expresión antes del descenso de los niveles de ARNm se alcanzó a los 51 d.e. Este patrón se observó en todos los grupos a pesar de que sólo fue estadísticamente significativo en el $1M_i$ (Figura 30). Los niveles de proteína de CYP1A1 y CYP1B1 en glándula mamaria no pudieron analizarse por motivos metodológicos.

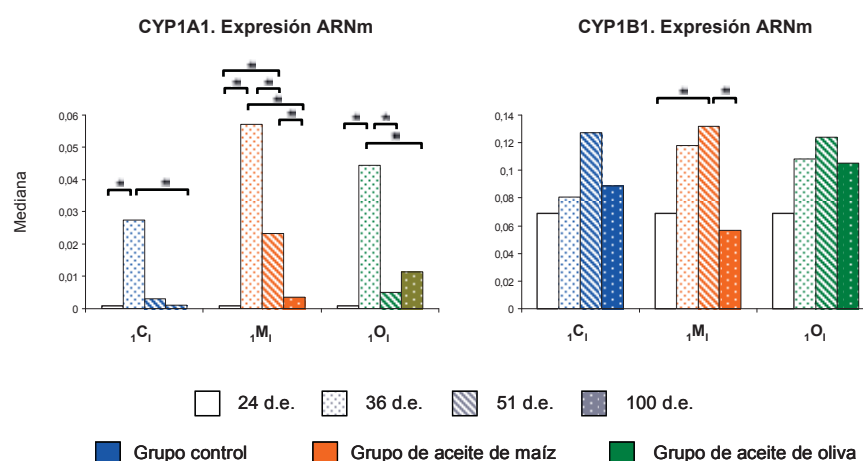


Figura 30. Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm de las XMEs de fase I en glándula mamaria. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p < 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En cuanto a las enzimas de fase II, los niveles de expresión de GSTP1 y NQO1 prácticamente no mostraron cambios en ningún grupo experimental (Figura 31.A.). Los niveles de proteína siguieron la misma tendencia en el caso de GSTP1. En cambio, los niveles de proteína de NQO1 aumentaron considerablemente a 100 d.e. en todos los grupos (Figura 31.B.). Esta situación se asemejó a lo ya observado para NQO1 en hígado a esta edad.

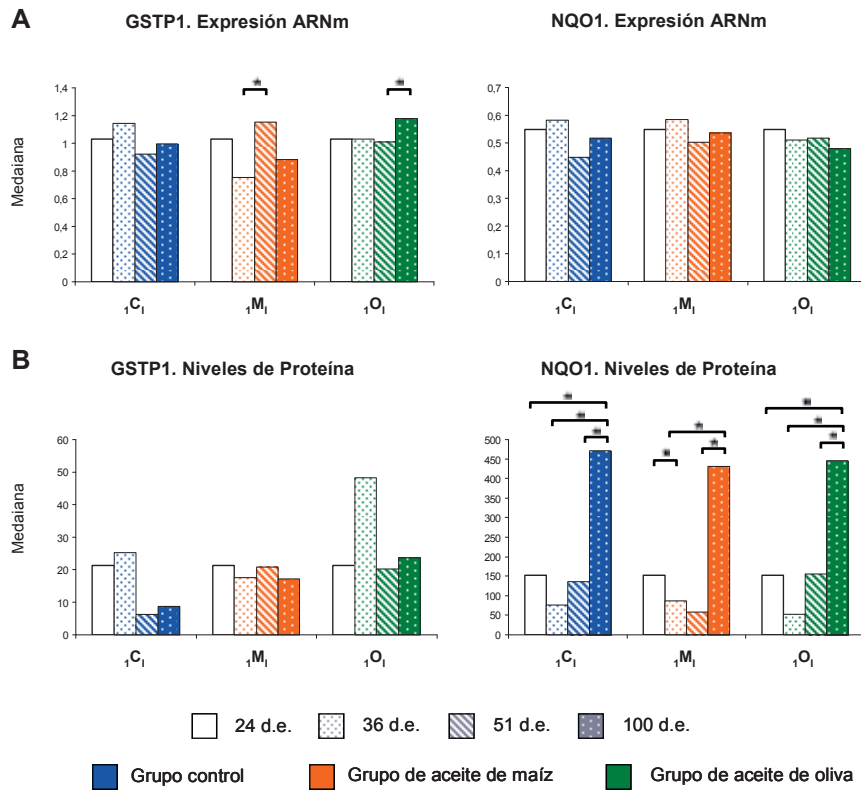


Figura 31. Efecto de la edad sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en glándula mamaria. A. Expresión de ARNm. B. Niveles de proteína. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Para los niveles de ARNm en glándula mamaria también se calcularon los valores de la ratio fase I/fase II para cada grupo experimental en todas las edades. Dicha ratio aumentó entre 24 y 36 d.e. en todos los grupos de forma significativa, siendo mayor en el $1M_i$. El valor más elevado de la ratio se observó a 36 d.e. en el grupo $1M_i$, y a 52 d.e. en los grupos $1C_i$ y $1O_i$ (Figura 29).

B. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA.

Con el objetivo de determinar el efecto de los lípidos de la dieta sobre las XMEs, se analizaron las diferencias en los niveles ARNm y de proteína entre los distintos grupos experimentales para cada una de las edades estudiadas. Además, se analizó si la modulación de las enzimas por los lípidos de la dieta se realizaba a nivel transcripcional, a través de sus efectos sobre los factores de transcripción AhR y Nrf2, cumpliendo así con el objetivo número 2 de este trabajo. Éste se desarrolló con las muestras procedentes de la serie experimental 1.

Todos los resultados se han expresado como porcentaje respecto al valor correspondiente a los 24 d.e., previa a la administración de las dietas experimentales.

1. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN HÍGADO.

El análisis de la expresión de las enzimas de fase I en hígado mostró una tendencia general a aumentar en el grupo $1M_i$ (Figura 32.A.). Así, los niveles de ARNm de CYP1A2 a 36, 51 y 100 d.e. en este grupo fueron superiores a los de los grupos $1C_i$ y $1O_i$ ($p \leq 0.05$ a 51 y 100 d.e.). Los niveles de expresión de CYP1A1 en el grupo $1M_i$ también fueron superiores a los de $1C_i$ y $1O_i$ en todas las edades, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas a 51 d.e. En cuanto a CYP1B1, a 100 d.e. los niveles de ARNm fueron también superiores en $1M_i$ (Figura 32.A.).

Al analizar si tales cambios podían estar mediados por un efecto a nivel transcripcional a través de AhR, se observó una menor retención citoplasmática de dicho factor de transcripción acompañada de unos niveles de proteína mayores en el grupo $1M_i$ a 51 d.e. comparado con los otros grupos experimentales (Figura 33.A.). Ambas situaciones estarían de acuerdo con la mayor expresión de las enzimas de fase I en este grupo experimental. El grupo $1O_i$, en cambio, presentó una tendencia a mayores niveles de retención citoplasmática de AhR y menores niveles de proteína con respecto al grupo $1M_i$, de acuerdo con las diferencias de expresión de los CYP1s observadas entre ambos grupos (Figura 33). Sin embargo, los niveles de ARNm de AhR fueron mayores en el grupo $1O_i$ en comparación con los otros dos grupos en todas las edades estudiadas (Figura 33.A.).

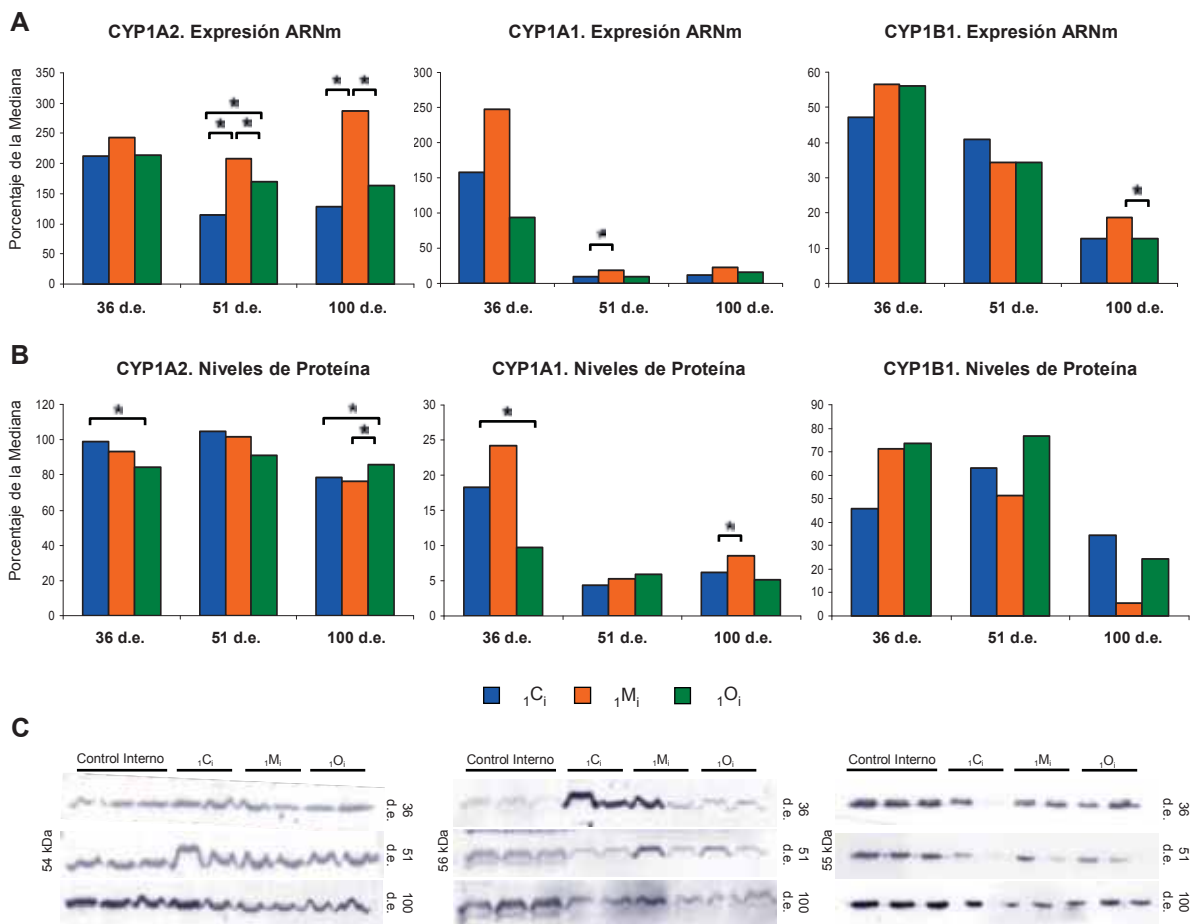


Figura 32. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase I en hígado. A. Expresión de ARNm. B. Niveles de proteína. C. Imágenes representativas de *Western Blot*. d.e.: días de edad; ₁C_i: grupo control inducido de la serie experimental 1; ₁M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; ₁O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Por su parte, los niveles de proteína de la familia CYP1 en hígado no presentaron una tendencia clara entre los distintos grupos y edades, las diferencias estadísticas fueron menores, y sus perfiles en general no coincidieron con los de la expresión del ARNm (Figura 32.B).

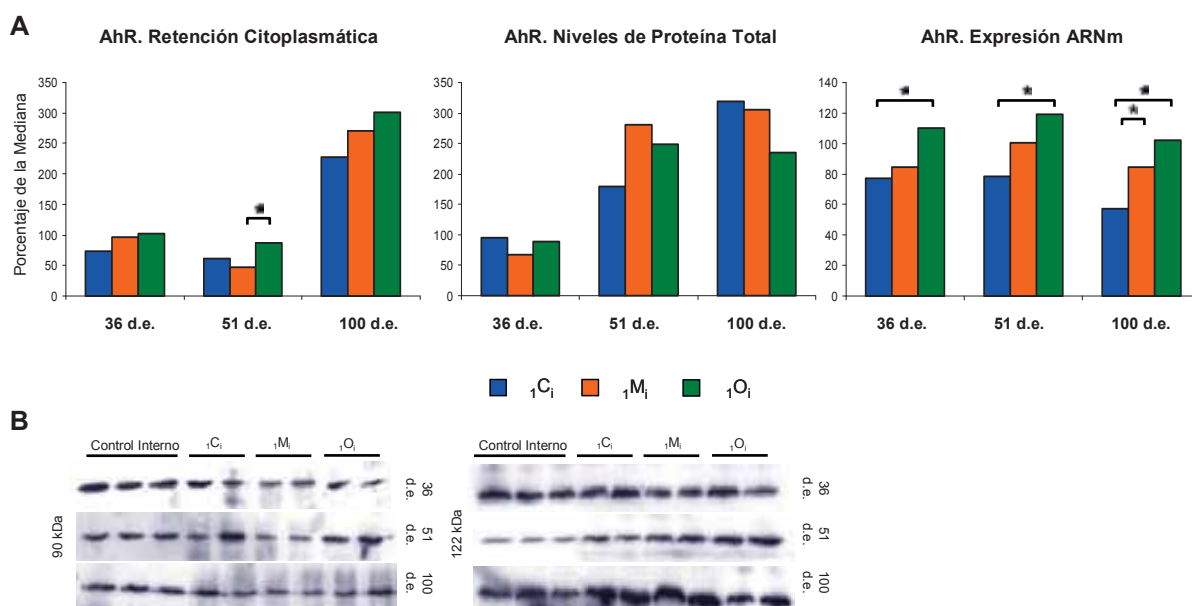


Figura 33. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión hepática de las XMEs de fase I a través de la modulación de AhR. A. Determinación de la retención citoplasmática de AhR a través de la medida de los niveles de AhR unido a Hsp90 (arriba). Imagen representativa de *Western Blot* (abajo). B. Niveles de proteína total (arriba) e imagen representativa de *Western Blot* (abajo). C. Expresión de ARNm. d.e.: días de edad; 1C_i: grupo control inducido de la serie experimental 1; 1M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; 1O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: p≤0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

La expresión de las enzimas de fase II en hígado presentó escasas diferencias significativas entre grupos y edades. A pesar de ello, la expresión de GSTP1 fue mayor en el grupo 1O_i a 36 y, especialmente, a 100 d.e. que en 1M_i y 1C_i. El ARNm de NQO1 fue inferior en 1M_i con respecto a los otros dos grupos, de forma significativa a 51 d.e. (Figura 34.A.). Por otro lado, el análisis de los niveles de proteína mostró diferencias significativas únicamente a 36 d.e. El grupo 1M_i exhibió mayores niveles de proteína con respecto a los otros dos grupos para GSTP1, y con respecto a 1O_i para NQO1. En este último caso, las diferencias entre los grupos 1O_i y 1C_i también fueron significativas (Figura 34.B.).

El análisis del grado de retención citoplasmática de Nrf2 mostró una reducción significativa en el grupo 1O_i a 100 d.e. comparada con los otros dos grupos. Asimismo, a 100 d.e. este mismo grupo presentó niveles superiores de proteína total en comparación con 1M_i (Figura 35.A.). Ambas situaciones serían compatibles con los mayores niveles de expresión de las XMEs de fase II en el grupo 1O_i comparado con 1M_i a 100 d.e., principalmente para GSTP1 (Figura 33.A.). Además, en todas las edades estudiadas el grupo 1M_i presentó los niveles más bajos de ARNm de Nrf2 (Figura 35.A.).

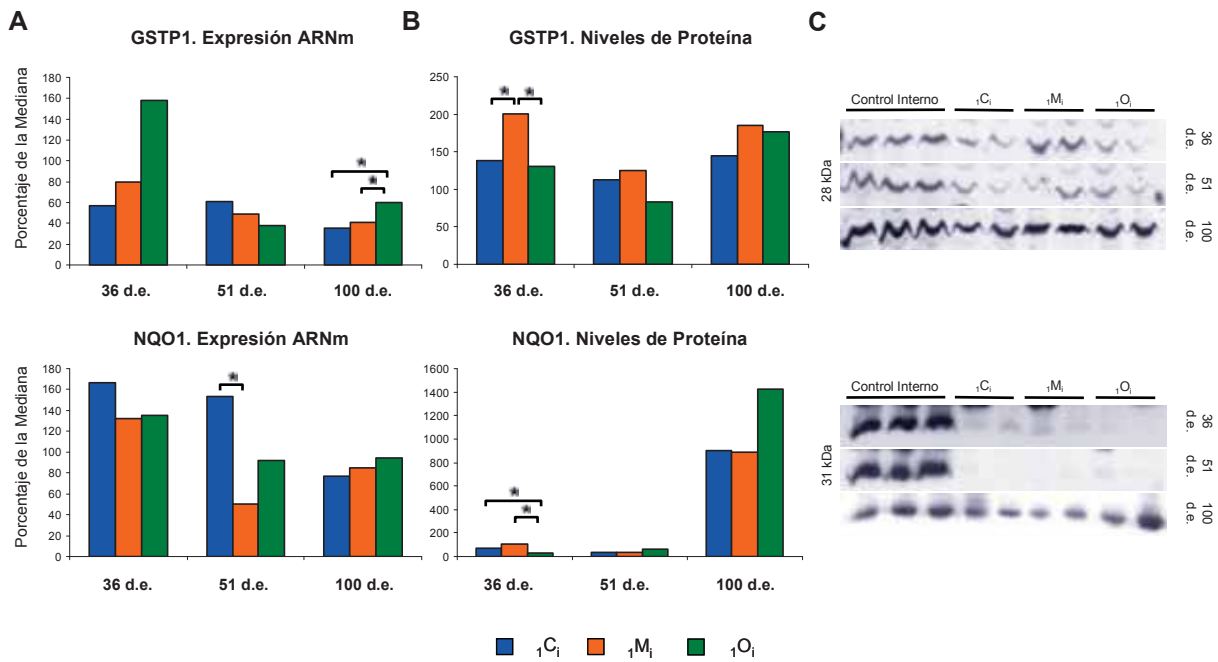


Figura 34. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en hígado. A. Expresión de ARNm. B. Niveles de proteína. C. Imágenes representativas de *Western Blot*. d.e.: días de edad; 1Ci: grupo control inducido de la serie experimental 1; 1Mi: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; 1Oi: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: p ≤ 0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

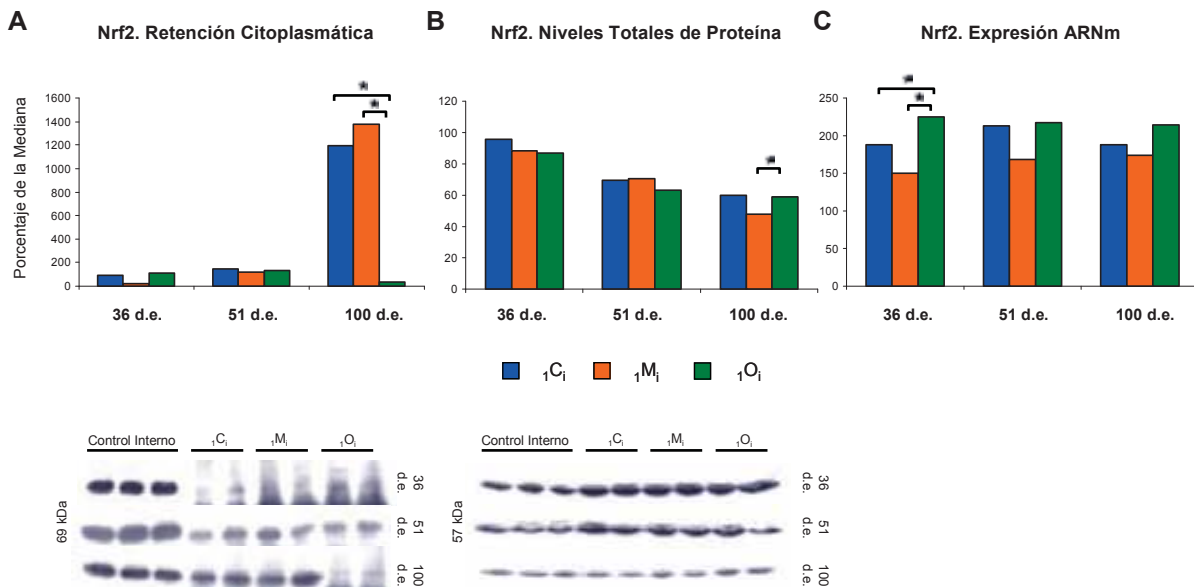


Figura 35. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión hepática de las XMEs de fase II a través de la modulación de Nrf2. A. Determinación de la retención citoplasmática de Nrf2 a través de la medida de los niveles de Nrf2 unido a Keap1 (arriba). Imagen representativa de *Western Blot* (abajo). B. Niveles de proteína total (arriba) e imagen representativa de *Western Blot* (abajo). C. Expresión de ARNm. d.e.: días de edad; 1Ci: grupo control inducido de la serie experimental 1; 1Mi: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; 1Oi: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: p ≤ 0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Al analizar la ratio fase I/fase II del ARNm en hígado se observó que el grupo $1M_i$ presentó valores más altos que los otros grupos en todas las edades, significativamente a 51 y 100 d.e. (Figura 36.A.). Este resultado estaría en concordancia con los mayores niveles de expresión de ARNm de las enzimas de fase I y los menores niveles de las de fase II observados en este grupo.

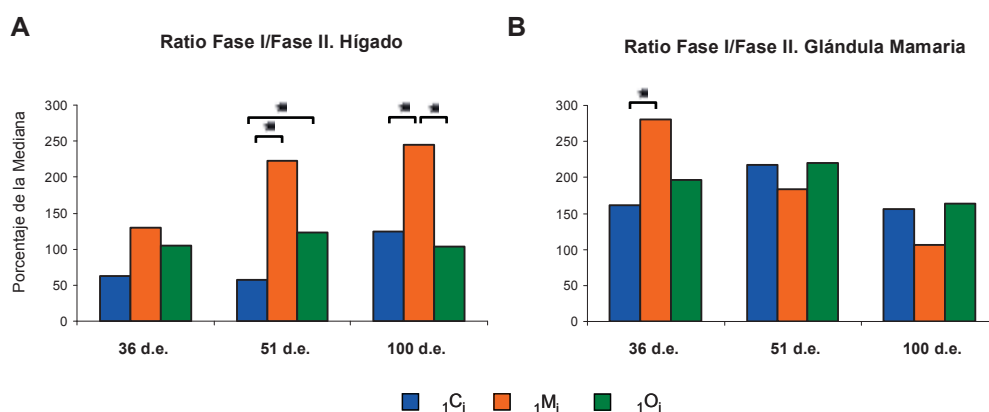


Figura 36. Balance del efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de las XMEs de fase I y fase II. Para cada animal se realizó por separado la suma de la expresión de las enzimas de fase I y las de fase II; ambos valores se dividieron entre sí y con los valores individuales que resultaron se calculó la mediana de cada grupo y se realizó el estudio estadístico. (A) Resultados en hígado (B) Resultados en glándula mamaria. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1. $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1. $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1. *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

2. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs EN GLÁNDULA MAMARIA.

Al estudiar la expresión de las XMEs de fase I en glándula mamaria se observó que CYP1A1 presentó un patrón similar al de hígado, especialmente a 36 y 51 d.e. Así, el grupo $1M_i$ fue el que mayores niveles de ARNm presentó a estas edades. Sin embargo, a 100 d.e. la situación se invirtió, siendo el grupo $1O_i$ el que presentó mayor expresión (Figura 37).

La expresión de CYP1B1 sólo mostró cambios significativos a 100 d.e., cuando el grupo $1O_i$ obtuvo los mayores niveles de ARNm y el $1M_i$, los más bajos (Figura 37).

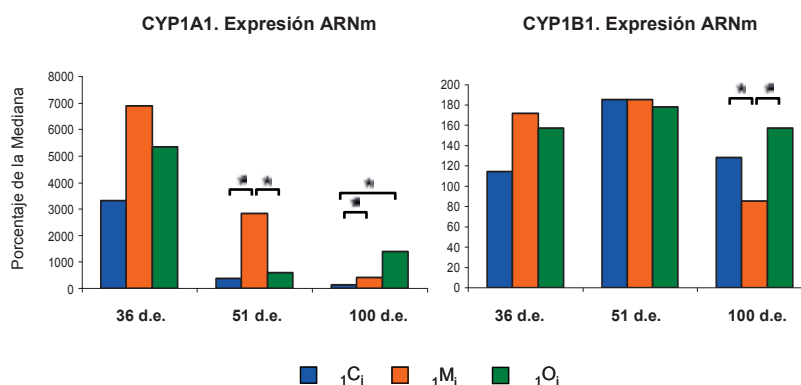


Figura 37. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de las XMEs de fase I en glándula mamaria. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

El análisis del ARNm de las enzimas de fase II en glándula mostró pocas diferencias significativas. Así, NQO1 no presentó cambios de expresión entre grupos en ninguna de las edades estudiadas (Figura 38.A.). En cuanto a GSTP1, su expresión disminuyó significativamente en el grupo $1M_i$ a 36 y 100 d.e. (Figura 38.A.).

Los niveles de proteína de GSTP1 y NQO1 en glándula tampoco variaron de forma significativa por efecto de la dieta a ninguna edad (Figura 38.B.).

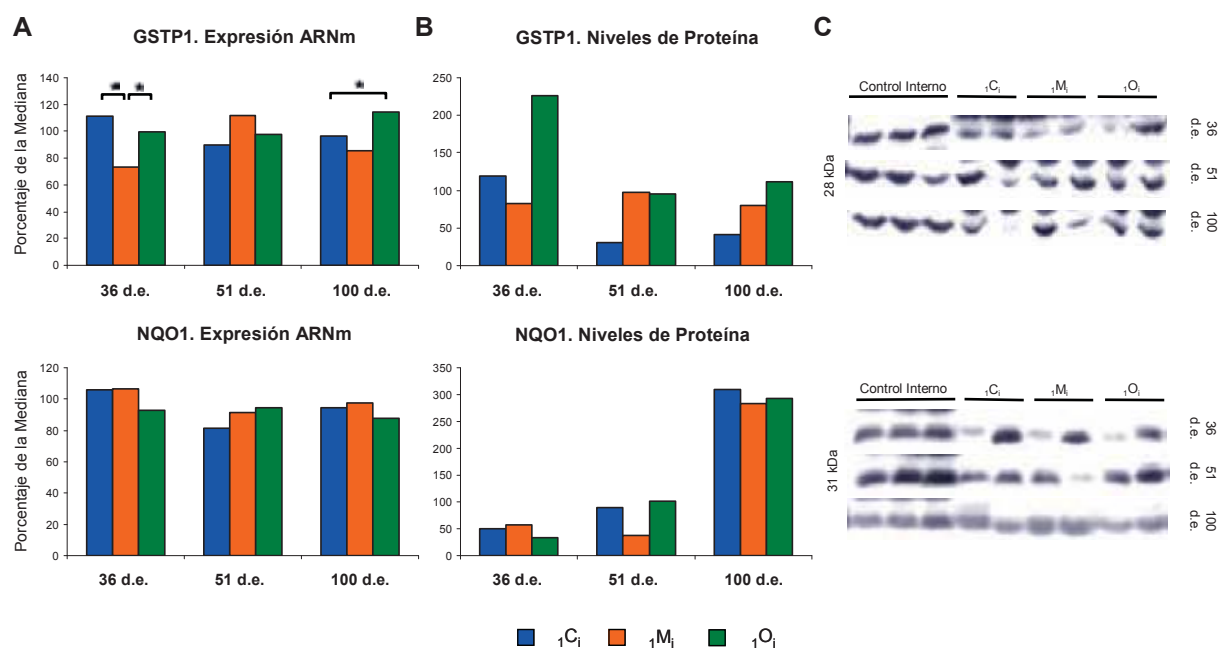


Figura 38. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm y proteína de las XMEs de fase II en glándula mamaria. A. Expresión de ARNm. B. Niveles de proteína. C. Imágenes representativas de *Western Blot*. d.e.: días de edad; 1C_i: grupo control inducido de la serie experimental 1; 1M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; 1O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1; *: p≤0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

El estudio de la ratio entre el ARNm de fase I y de fase II en glándula mamaria mostró el mismo perfil que en hígado a 36 d.e., de manera que ésta fue mayor en el grupo 1M_i (p≤0.05 en comparación con 1C_i). En las otras edades analizadas, no hubo diferencias entre grupos (Figura 36.B.).

C. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL DMBA.

Tras los resultados obtenidos en la serie experimental 1, se planteó la segunda serie en la que se investigó la influencia de los lípidos de la dieta en el metabolismo de xenobióticos en los periodos inmediatamente posteriores a la exposición a éstos, como mecanismo de su acción moduladora en la iniciación de la carcinogénesis mamaria. Para ello, se analizó la expresión y actividad de las XMEs, la formación de metabolitos reactivos del DMBA en hígado y la de aductos premutagénicos DMBA-ADN en tejido diana (Objetivo 3).

1. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LAS XMEs DE FASE I EN HÍGADO.

En este estudio se analizaron CYP1A1 y CYP1B1 dada la importancia de estas enzimas en el metabolismo de PAHs en comparación con CYP1A2.

La expresión de ARNm de CYP1A1 a 52 d.e. (Figura 39.A.), situación previa a la administración del DMBA, presentó el mismo patrón que el hallado en la serie experimental 1 a 51 d.e. (Figura 32.A.). Así, el grupo $2M$ tuvo niveles de expresión significativamente mayores que los otros dos grupos. La expresión de CYP1B1 a 52 d.e. también fue mayor en el grupo $2M$ con respecto a $2C$ y $2O$, aunque de forma no significativa (Figura 39.A.).

Doce horas después de la administración del DMBA (53.5 d.e.) se produjo un aumento muy importante de los niveles de ARNm de ambas enzimas, CYP1A1 y CYP1B1, en todos los grupos experimentales (Figura 39.A., Figura 39.B.). Dicho aumento fue del orden de 3000-26000 veces en el caso de CYP1A1 y de entre 24 y 175 veces en el caso de CYP1B1. Tras este incremento, en todos los grupos se produjo una disminución paulatina de la expresión de ARNm tanto de CYP1A1 como de CYP1B1 hasta alcanzar, a partir de los 63 d.e., una situación similar a la de las 24 horas previas a la inducción carcinogénica (52 d.e.). El análisis estadístico de los cambios observados en cada grupo experimental a lo largo del tiempo (Figura 39.C.) confirmaron lo descrito. Así, la falta de significación estadística a partir de 63 d.e. estaría de acuerdo con el retorno a los niveles de expresión basal. El efecto de la administración del DMBA sobre la expresión de estas enzimas también se puso de manifiesto al comparar la expresión en los animales inducidos con la de los sanos. Tal como se puede observar en la Tabla 11, entre 5 y 10 días después de dicha administración (58 y 63 d.e.,

respectivamente) la expresión de las enzimas de los animales inducidos volvió a ser similar a la de los animales sanos (relación entre ambos con valores cercanos a 1)

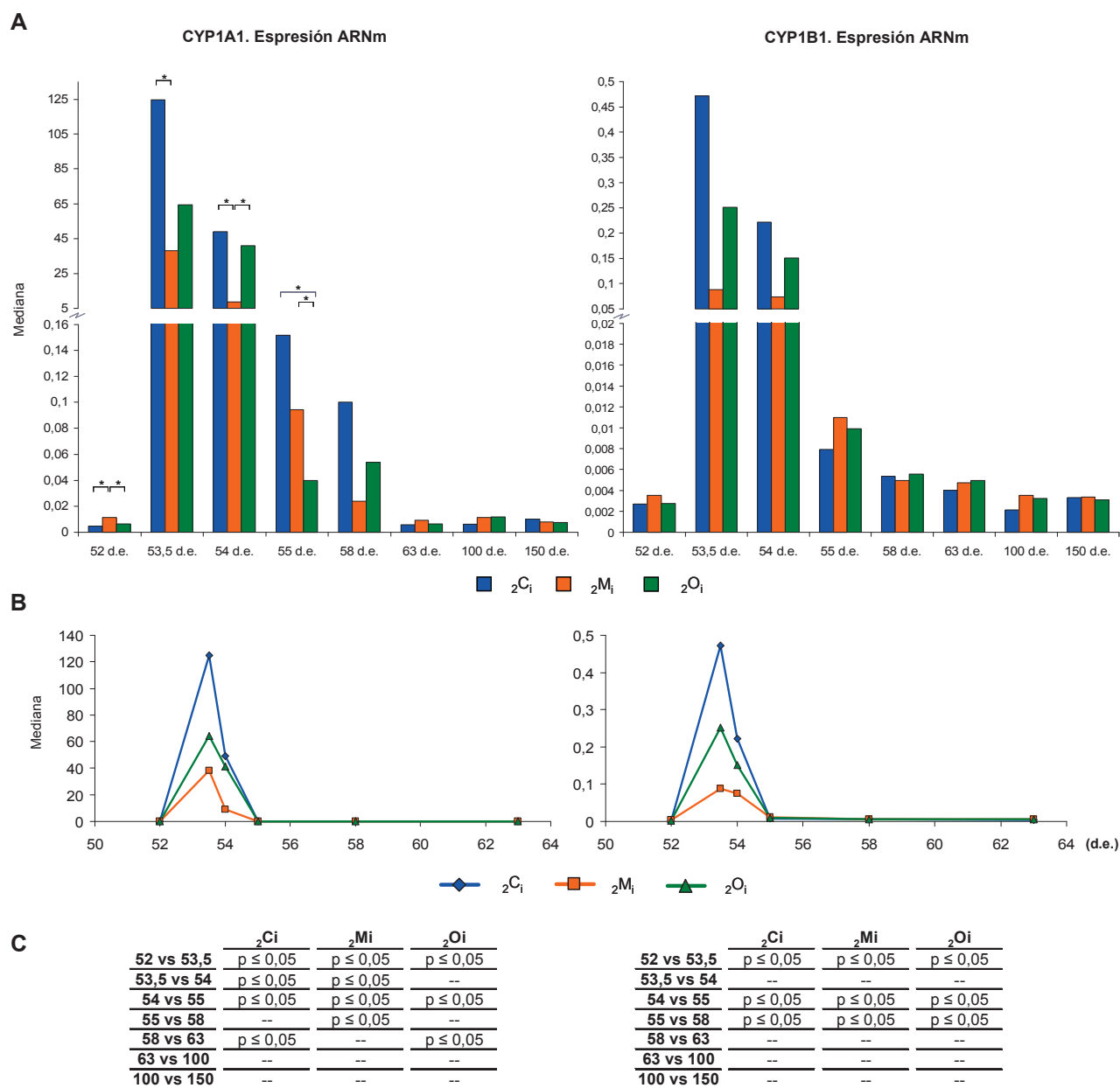


Figura 39. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 en hígado de animales inducidos con DMBA. A. Niveles de ARNm en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la expresión de ARNm en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Tabla 11. Comparación de la expresión de ARNm de las XMEs y de los factores de transcripción AhR y Nrf2 entre animales inducidos y sanos.

		Expresión ARNm Inducidos/Sanos †							
		52 d.e.	53,5 d.e.	54 d.e.	55 d.e.	58 d.e.	63 d.e.	100 d.e.	150 d.e.
CYP1A1	$2C_i/2C_s$	1,00	7912,48	6200,46	39,21	15,02	1,09	1,04	3,83
	$2M_i/2M_s$	1,00	2669,95	1178,24	8,63	2,33	1,13	1,49	2,54
	$2O_i/2O_s$	1,00	2225,04	6437,89	8,38	5,89	0,95	1,22	1,38
CYP1B1	$2C_i/2C_s$	1,00	507,35	109,88	3,02	1,55	1,53	1,15	1,92
	$2M_i/2M_s$	1,00	95,63	20,89	1,92	0,81	2,06	1,53	2,20
	$2O_i/2O_s$	1,00	157,66	58,49	1,74	1,02	2,78	1,06	2,42
NQO1	$2C_i/2C_s$	1,00	25,75	2,57	1,06	1,26	0,49	0,79	2,12
	$2M_i/2M_s$	1,00	17,89	1,91	1,38	0,53	0,99	0,87	1,64
	$2O_i/2O_s$	1,00	25,88	4,71	0,72	1,85	0,66	1,56	0,88
GSTP1	$2C_i/2C_s$	1,00	2,44	2,08	3,59	1,61	1,46	1,13	0,90
	$2M_i/2M_s$	1,00	1,88	1,46	1,40	0,77	0,84	1,16	0,67
	$2O_i/2O_s$	1,00	1,66	1,47	1,28	1,02	1,10	1,03	1,11
AhR	$2C_i/2C_s$	1,00	0,97	1,36	0,97	0,84	0,60	1,21	1,62
	$2M_i/2M_s$	1,00	0,77	1,81	1,04	0,85	0,93	1,26	1,45
	$2O_i/2O_s$	1,00	1,44	1,97	0,86	1,05	0,89	1,28	1,54
Nrf2	$2C_i/2C_s$	1,00	2,90	1,80	1,28	1,24	1,07	0,95	1,08
	$2M_i/2M_s$	1,00	1,61	1,55	1,41	1,36	0,98	1,33	1,76
	$2O_i/2O_s$	1,00	2,51	1,71	0,93	0,87	1,06	1,04	1,76

† Los valores de las medianas de expresión de ARNm para cada enzima y factor de transcripción en las distintas edades de los animales inducidos fueron divididos por los correspondientes valores de las medianas de los animales sanos. d.e.: días de edad; $2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; $2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; $2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; $2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; $2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; $2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

En relación a la influencia de los lípidos de la dieta, se observó que a 12 y 24 horas post inducción (53.5 y 54 d.e., respectivamente) la expresión de CYP1A1 en el grupo $2M_i$ fue significativamente inferior a la de $2C_i$ y $2O_i$. A 55 d.e., sin embargo, fue el grupo $2O_i$ el que presentó los niveles más bajos de expresión con respecto a los otros grupos (Figura 39.A.). En la figura 38.B. se representa la evolución de la expresión de ARNm en los distintos grupos a lo largo del tiempo. Al comparar dicha evolución entre grupos, a lo largo de todo el estudio mediante el análisis no paramétrico de Friedman, los resultados mostraron que la expresión de CYP1A1 fue significativamente superior en $2C_i$ respecto a $2O_i$ y en $2O_i$ respecto a $2M_i$ entre los 52 y 150 d.e. y superior en $2C_i$ respecto a $2M_i$ entre 52 y 63 d.e. (Figura 39.A. y Figura 39.B.). En el caso de CYP1B1 los patrones de expresión fueron muy similares a los de CYP1A1, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas.

Por otra parte, los resultados observados en los grupos de animales sanos (Figura 40), mostraron que la administración del vehículo produjo ciertas modificaciones en la expresión de las enzimas de fase I estudiadas, aunque este efecto fue de mucha menor importancia que el del carcinógeno y de naturaleza distinta según la enzima. Así, al comparar la expresión de CYP1A1 antes y después de la administración del vehículo se observó un ligero aumento, del orden de 1.3 a 4.6 veces superior en 53.5 d.e. con respecto a 52 d.e., mayor en los grupos $2C_s$ y $2O_s$. En cambio, la expresión de CYP1B1 disminuyó ligeramente, entre 1.7 y 3.8 veces inferior en 53.5 con respecto a 52 d.e., en todos los grupos. En ambos casos, rápidamente se recuperó la situación inicial, entre los 54 y 55 d.e. (Figura 40.A. y Figura 40.C.), obteniéndose un perfil de expresión similar al observado a 52 d.e., anteriormente descrito para los grupos inducidos, en el que el grupo $2M_s$ presentó mayores niveles de expresión que los otros dos grupos. Este perfil, que presentó escasas significaciones estadísticas, se observó más claramente en el caso de CYP1A1 a los 52, 55, 58 y 63 d.e. (Figura 40.A.) y dejó de observarse a 100 y 150 d.e. en ambas enzimas. La comparación de la evolución de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo entre grupos mediante el análisis Friedman mostró que las dos dietas hiperlipídicas en general aumentaron la expresión de los CYP1s respecto a la dieta control, siendo significativas las diferencias en CYP1A1 entre los grupos $2C_s$ y $2O_s$ ($2C_s < 2O_s$) entre 52 y 150 d.e. y en CYP1B1 entre 52 y 58 d.e. La expresión de ambas enzimas a lo largo del estudio en el grupo $2M_s$ tendió a ser mayor que en el grupo $2O_s$, pero con escasas significaciones estadísticas (Figura 40.A. y Figura 40.B.).

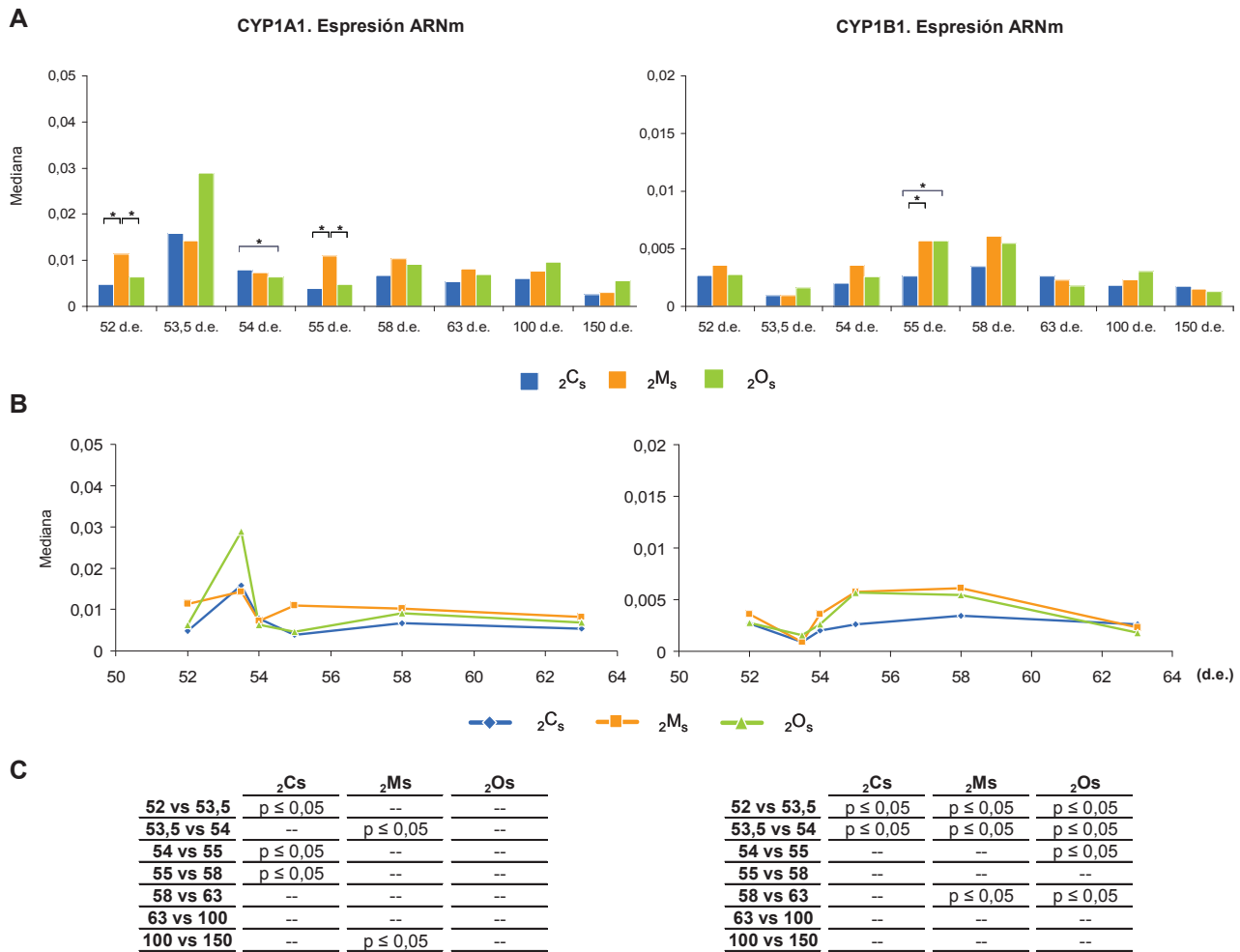


Figura 40. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 en hígado de animales sanos. A. Niveles de ARNm en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la expresión de ARNm en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas d.e.: días de edad; 2Cs: grupo control sano de la serie experimental 2; 2Ms: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; 2Os: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; *: p≤0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

La actividad de las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 se determinó a través de ensayos EROD. Se observó que tras la administración del DMBA se produjo un importante aumento de la actividad enzimática en todos los grupos experimentales, del orden de 27-65 veces superior a 53.5 d.e. comparado con 52 d.e., siendo el grupo 2M_i el que presentó el mayor incremento. Además, tras este aumento a las 12 horas post inducción, se observó un descenso paulatino en todos los grupos hasta alcanzar a los 58 d.e. una situación similar a la previa a la inducción (Figura 41 y Tabla 12).

Los resultados también mostraron que la actividad de CYP1A1 y CYP1B1 a 52 d.e. presentaba un patrón inverso al de los niveles de ARNm a esa misma edad. Así, el grupo $2M$ presentó niveles de actividad significativamente inferiores a los otros dos grupos experimentales (Figura 41.A.). Sin embargo, 12 horas después de la administración del carcinógeno fue el grupo $2M_i$ el que presentó niveles de actividad superiores a los otros dos, siendo significativa la diferencia con respecto al grupo $2O_i$. En cambio, a 54, 55 y 58 d.e. la actividad en el grupo $2M_i$ disminuyó por debajo de la de $2C_i$ y $2O_i$ (Figura 41.A.).

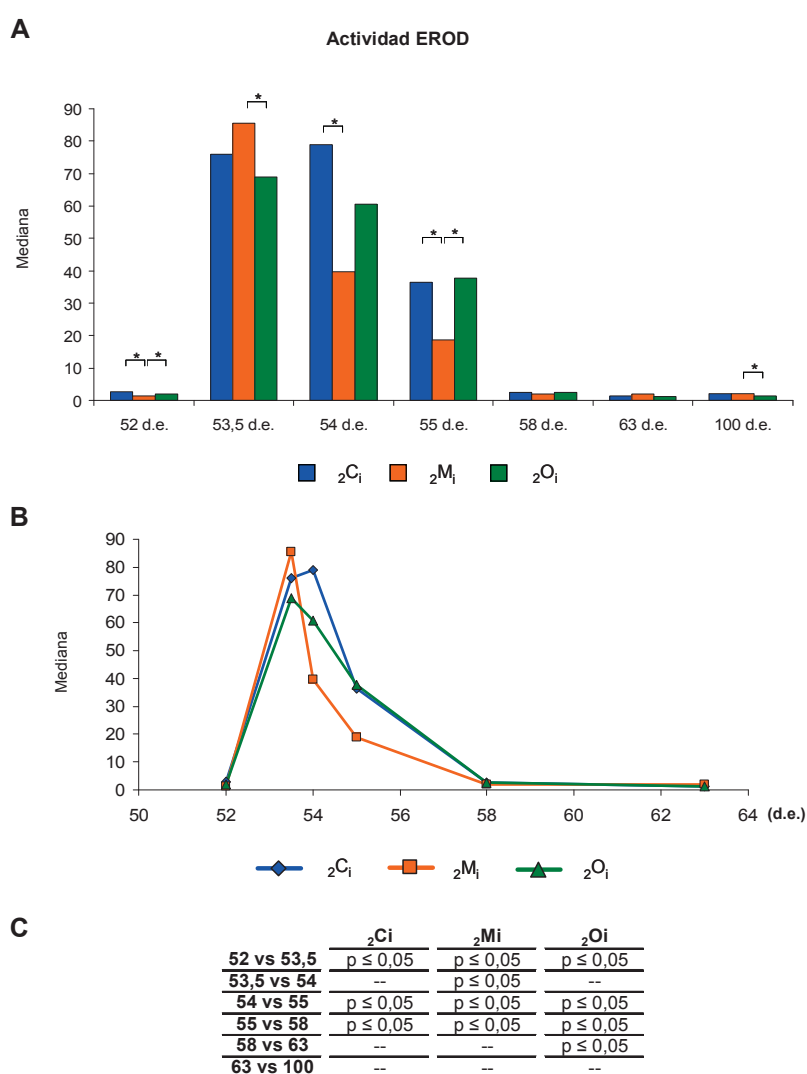


Figura 41. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad EROD en hígado de animales inducidos con DMBA. A. Actividad EROD en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la actividad EROD en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la actividad a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; $2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; $2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; $2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Tabla 12. Comparación de la actividad enzimática de las XMEs entre animales inducidos y sanos.

		Actividad Inducidos/Sanos [†]						
		52 d.e.	53,5 d.e.	54 d.e.	55 d.e.	58 d.e.	63 d.e.	100 d.e.
EROD	₂ C _i / ₂ C _s	1,00	52,37	66,65	16,84	1,74	0,50	0,85
	₂ M _i / ₂ M _s	1,00	36,33	13,12	8,04	1,09	1,10	0,74
	₂ O _i / ₂ O _s	1,00	52,69	20,51	16,60	1,10	0,49	0,48
NQO1	₂ C _i / ₂ C _s	1,00	13,41	12,06	7,18	15,69	2,15	0,49
	₂ M _i / ₂ M _s	1,00	7,39	10,08	11,06	5,63	1,74	0,69
	₂ O _i / ₂ O _s	1,00	6,74	9,10	19,26	16,97	0,54	1,15
GST	₂ C _i / ₂ C _s	1,00	1,36	1,10	1,55	1,00	1,16	1,13
	₂ M _i / ₂ M _s	1,00	1,24	1,13	1,31	1,08	1,47	0,80
	₂ O _i / ₂ O _s	1,00	1,12	0,98	1,66	1,34	1,09	0,67

Los valores de las medianas de actividad para cada enzima en las distintas edades de los animales inducidos fueron divididos por los correspondientes valores de las medianas de los animales sanos. d.e.: días de edad; ₂C_s: grupo control sano de la serie experimental 2; ₂C_i: grupo control inducido de la serie experimental 2; ₂M_s: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; ₂M_i: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ₂O_s: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; ₂O_i: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

En base a estos resultados se pudo constatar que los perfiles de expresión y actividad se correspondieron entre sí aunque con un cierto retraso en el tiempo. Así, los patrones de expresión de ARNm a 52, 53.5 y 54 d.e. (Figura 39.A.) de ambas enzimas se correspondieron con los patrones de actividad observados a 53.5, 54 y 55 d.e., respectivamente (Figura 41.A.). Asimismo, se comprobó que mientras los niveles de actividad enzimática volvieron a la situación basal, la previa a la inducción, a los 58 d.e., 5 días post inducción (Figura 36 y Tabla 12), los niveles de ARNm, especialmente los de CYP1A1, no lo hicieron hasta los 63 d.e., 10 días post inducción (Figura 39 y Tabla 11).

La actividad EROD en los animales sanos presentó pocos cambios tras la administración del vehículo (Figura 42.A. y Figura 42.B.). Así, mientras en el grupo ₂M_i se observó un ligero aumento (del orden de 1.7 veces) a 53.5 d.e. con respecto a 52 d.e., los grupos ₂C_i y ₂O_i sufrieron un ligero descenso (del orden de 1.9 y 1.5, respectivamente). Estos cambios fueron significativos únicamente en el caso de los grupos ₂C_i y ₂O_i (Figura 42.C.). Del mismo modo, las ligeras variaciones posteriores a 53.5 d.e. no fueron estadísticamente significativas, con la excepción de un pequeño aumento entre los 53.5 y 54 d.e. en el grupo ₂O_i.

Finalmente, cabe destacar que el perfil de actividad observado a 53.5 d.e. en los grupos de animales inducidos (Figura 41.A.) también se observó a menor escala en los grupos de sanos (Figura 42.A.). Además, este perfil siguió el mismo patrón de retraso con respecto al del ARNm (Figura 40.A.) observado en los grupos inducidos.

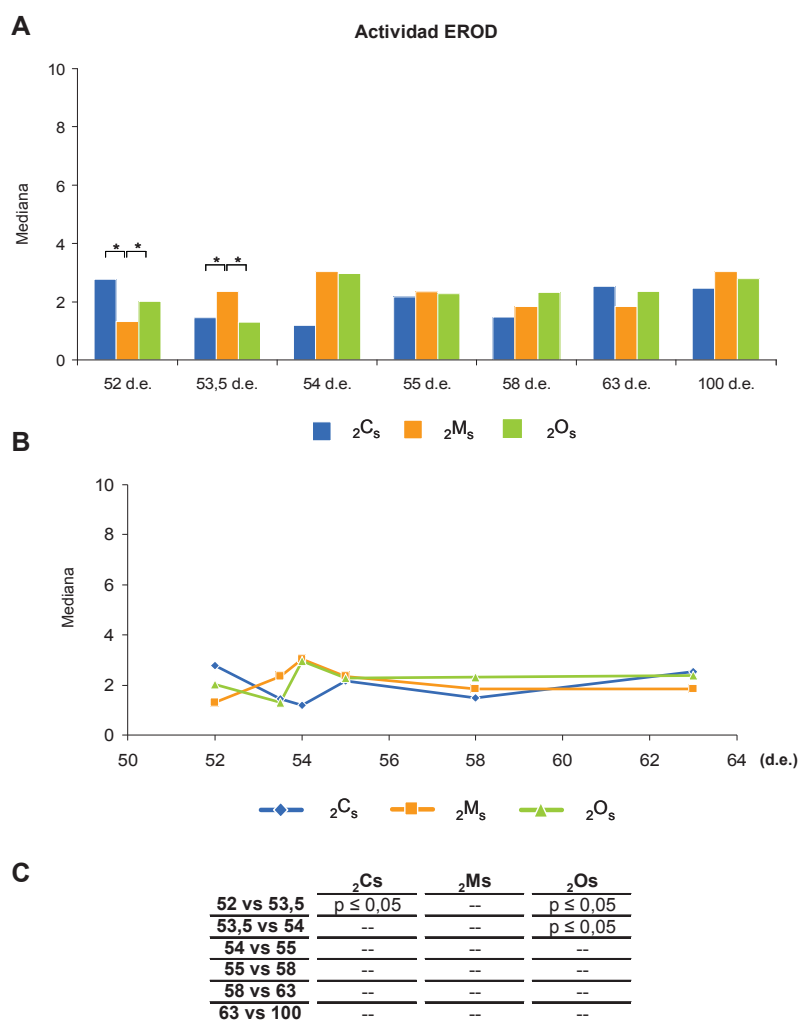


Figura 42. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad EROD en hígado de animales sanos. A. Actividad EROD en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la actividad EROD en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la actividad a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; ${}_2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; ${}_2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

2. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LAS XMES DE FASE II EN HÍGADO.

Tal y como ya se observó en la serie experimental 1, en la serie 2 en general las enzimas de fase II en comparación con las de fase I presentaron una menor modulación de su expresión por parte de los lípidos.

De las dos enzimas de fase II estudiadas, la expresión de ARNm de NQO1 presentó una mayor variación tanto por efecto de los lípidos de la dieta como de la inducción con el carcinógeno. Así, a 52 d.e. se observó una menor expresión de ARNm en ambos grupos de dieta hiperlipídica comparados con el grupo control (Figura 43.A.). Tras la administración del DMBA (53.5 d.e.) se observó un aumento, del orden de 5-6 veces, de la expresión de ARNm en todos los grupos experimentales. Tal y como se puede observar en la Figura 43.C. y en la Tabla 11, este incremento disminuyó rápidamente hasta alcanzar niveles similares a los previos a la inducción alrededor de los 55 d.e.

Al estudiar el efecto de los lípidos de la dieta en los animales inducidos, se observó que al comparar la evolución de ARNm de NQO1 a lo largo del tiempo entre grupos (Figura 43.A. y Figura 43.B), mediante el análisis no paramétrico de Friedman, el grupo ${}_2C_i$ presentó valores superiores a los otros dos grupos de forma significativa entre los 52 y 150 d.e., sin observarse diferencias al comparar los dos grupos de dietas hiperlipídicas entre sí. A pesar de las escasas diferencias de expresión entre los grupos ${}_2M_i$ y ${}_2O_i$, resulta interesante destacar que en algunas edades tras la inducción el grupo ${}_2O_i$ presentó valores superiores al ${}_2M_i$, como son las 12 horas post inducción (53.5 d.e.), de forma no significativa, y las 24 horas post inducción (54 d.e.), estadísticamente significativa (Figura 43.A.).

En el caso de la expresión de ARNm de NQO1 en animales sanos se observó que tras la administración del vehículo se produjo una disminución, del orden de 3-4 veces, de los niveles de ARNm en todos los grupos al comparar 53.5 con 52 d.e. Los niveles volvieron a la expresión basal, similar a la de 52 d.e., a las 24 horas tras la administración del vehículo (54 d.e.) (Figura 44). Asimismo, el análisis de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo entre grupos demostró que, del mismo modo que ocurrió en los animales inducidos, el grupo ${}_2C_s$ presentó niveles significativamente superiores a los de los grupos ${}_2M_s$ y ${}_2O_s$ entre los 52 y 150 d.e., mientras que las diferencias entre los grupos ${}_2M_s$ y ${}_2O_s$ fueron más variables y no presentaron significación estadística en el estudio a lo largo del tiempo (análisis no

paramétrico de Friedman), y presentaron escasas significaciones al comparar los grupos entre sí dentro de cada una de las distintas edades (análisis no paramétrico U de Mann-Whitney) (Figura 44.A. y Figura 44.B.).

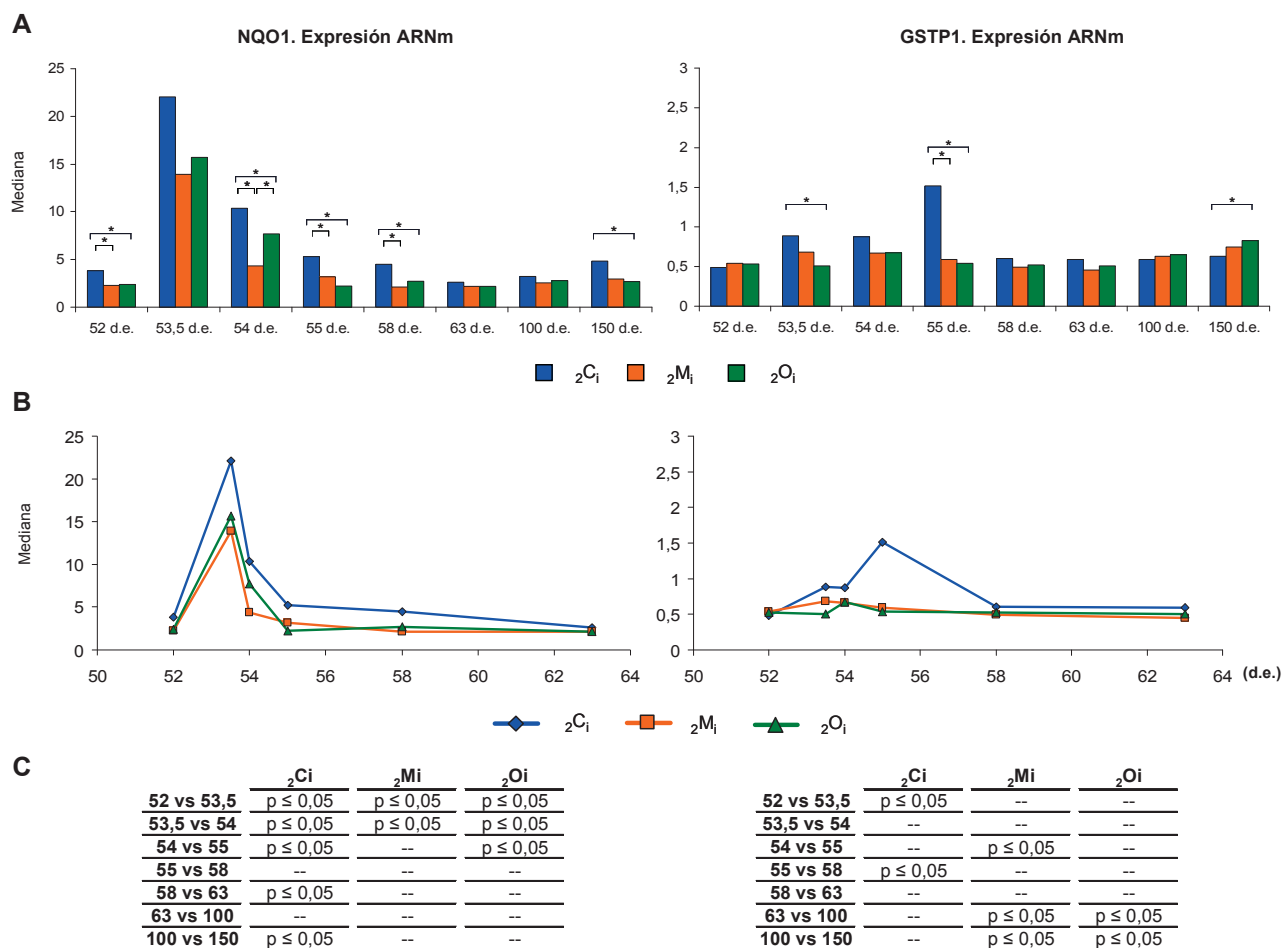


Figura 43. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de NQO1 y GSTP1 en hígado de animales inducidos con DMBA. A. Niveles de ARNm en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la expresión de ARNm en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

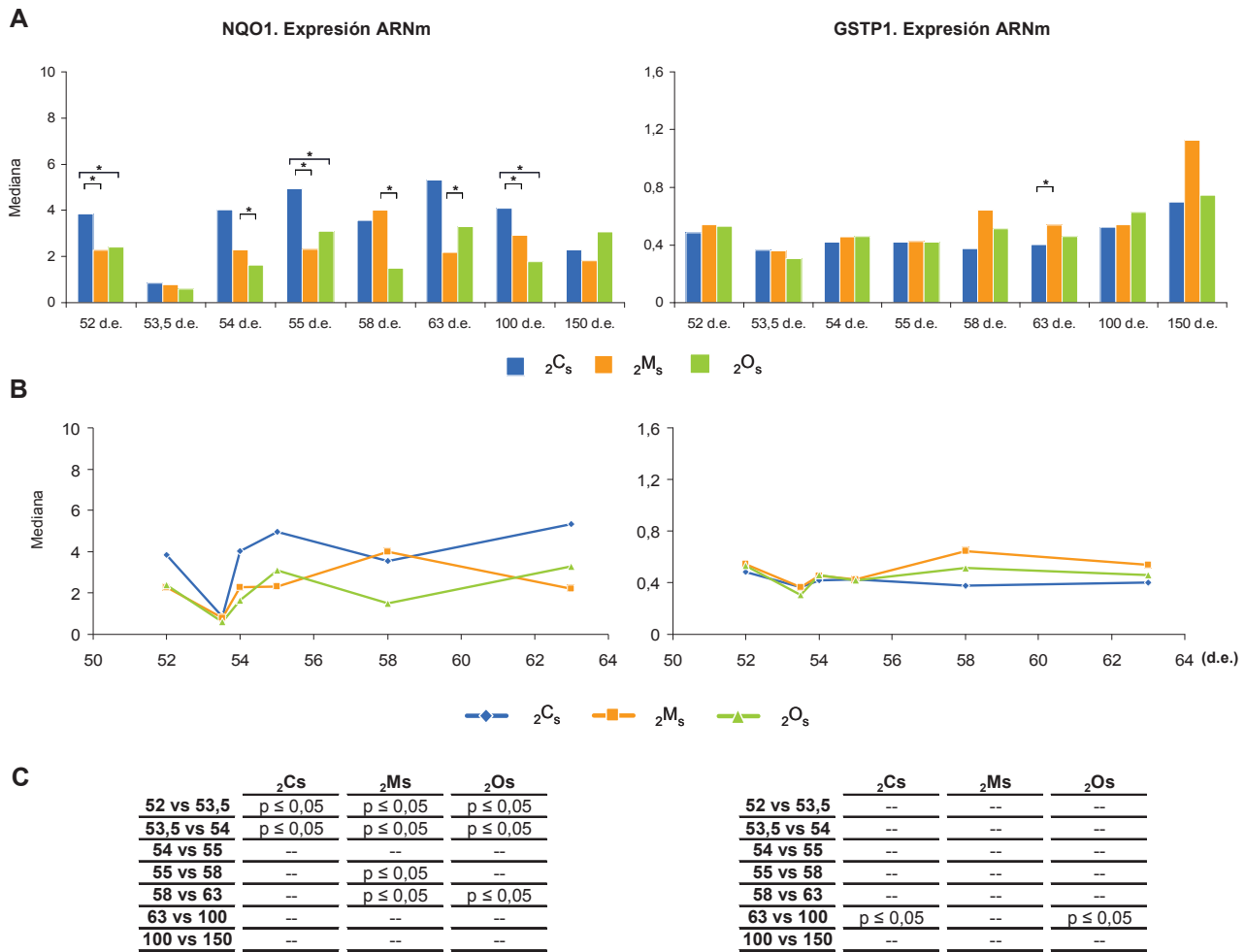


Figura 44. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de NQO1 y GSTP1 en el hígado de los animales sanos. A. Niveles de ARNm en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la expresión de ARNm en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas d.e.: días de edad; $2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; $2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; $2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Por otra parte, los niveles de ARNm de GSTP1 presentaron muy pocas variaciones. En animales inducidos, la administración del DMBA se asoció con un ligero aumento únicamente en el grupo $2C_i$, de manera que a 53.5 y 55 d.e. presentó niveles superiores de expresión, del orden de 1.8 y 3.1 veces, respectivamente, comparado con la expresión a 52 d.e. De igual modo, su expresión fue superior en el grupo $2C_i$ que en los grupos $2M_i$ y $2O_i$. Los grupos alimentados con dietas hiperlipídicas no presentaron prácticamente modificaciones de la expresión de GSTP1 a lo largo del tiempo. (Figura 43.A., Figura 43.B. y Tabla 11).

En animales sanos, la expresión de GSTP1 presentó escasas variaciones significativas. La administración del vehículo tendió a disminuir muy ligeramente dicha expresión (del orden de 1.3-1.7). En relación al efecto de los lípidos de la dieta, el grupo $2M_s$ presentó un aumento de la expresión con respecto a los otros grupos a 58, 63 y 150 d.e., siendo las diferencias únicamente significativas a 63 d.e. (Figura 44).

Del mismo modo que para el ARNm, la actividad enzimática de NQO1 fue la que presentó mayores diferencias a lo largo del estudio. A 52 d.e. se observó que el grupo $2M_i$ presentó valores significativamente inferiores a los de $2C_i$ y $2O_i$ (Figura 45.A.). Tras la administración del DMBA se produjo un aumento paulatino de los niveles de actividad en todos los grupos hasta alcanzar el valor más alto a las 48 horas post inducción (55 d.e.), obteniéndose niveles del orden de 6 a 20 veces superiores en comparación con los observados a 52 d.e. Posteriormente, la actividad de NQO1 disminuyó progresivamente hasta volver a una situación similar a la inicial entre los 63 y 100 d.e. (Figura 45 y Tabla 12). Las dietas experimentales mostraron un efecto similar al observado en el ARNm. Así, la dieta control presentó de forma general niveles de actividad superiores a los grupos de dietas hiperlipídicas (Figura 45.A., Figura 45.B.), obteniéndose, en el análisis no paramétrico de Friedman, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos $2C_i$ y $2M_i$ entre los 52 y 100 d.e. A pesar de que el grupo $2O_i$ presentó niveles de actividad superiores a los de $2M_i$ principalmente a los 55 y 58 d.e. globalmente las diferencias no fueron significativas (Figura 45.A. y Figura 45.B.) Cabe destacar que el patrón de expresión del ARNm y el de actividad de NQO1 mostraron un retraso entre ambos, de forma similar a lo observado en el caso de las enzimas de fase I. Así, el perfil de expresión de los valores más altos de ARNm a 53.5 y 54 d.e. (Figura 43.A.) fue similar al de los valores de mayor actividad de NQO1 a 55 y 58 d.e. respectivamente (Figura 45.A.)

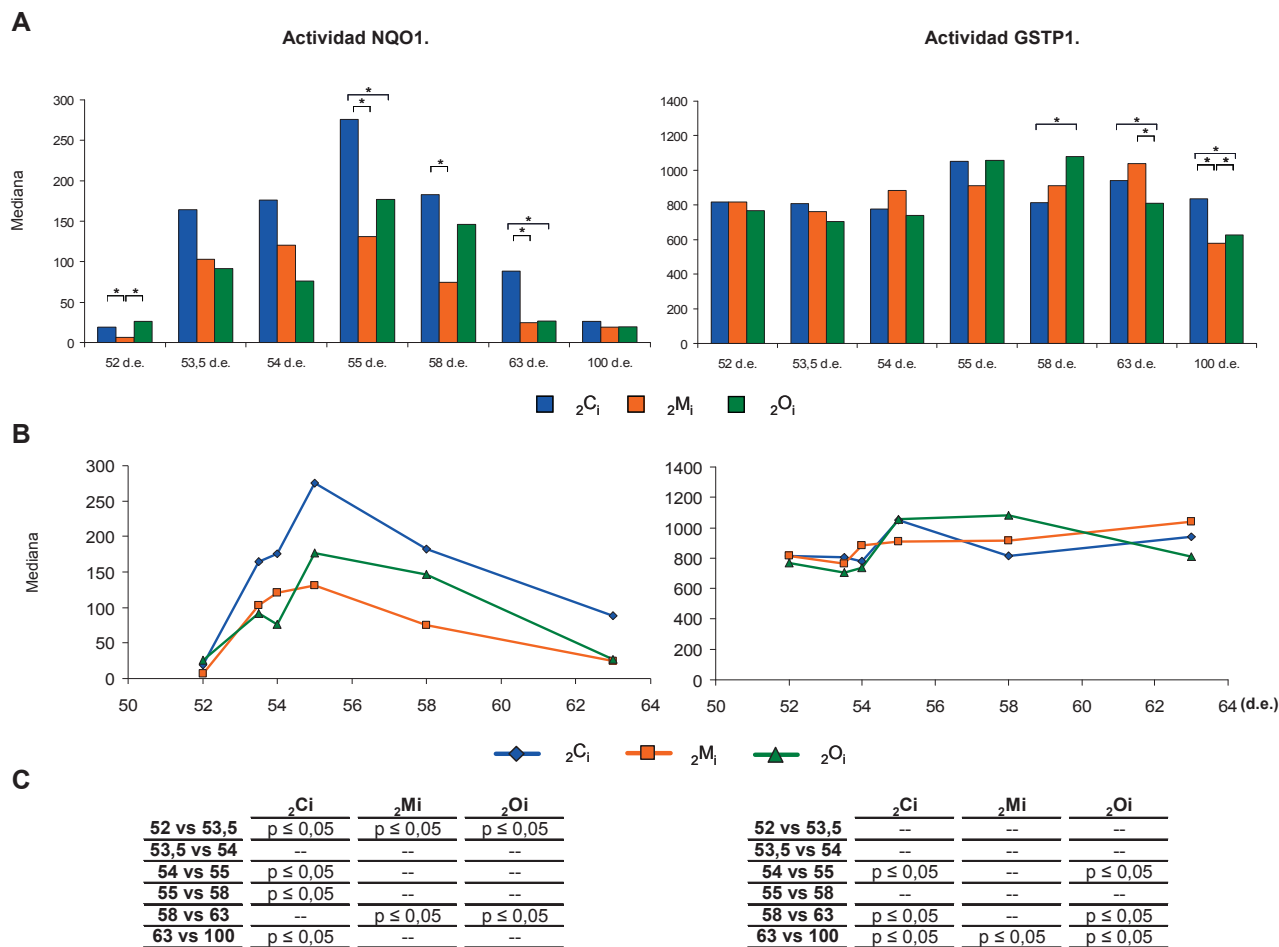


Figura 45. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad NQO1 y GST en hígado de animales inducidos con DMBA. A. Actividad enzimática en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la actividad en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la actividad a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En relación a la actividad de NQO1 en animales sanos, ésta presentó pocas variaciones a lo largo del estudio (Figura 46). El efecto del vehículo fue escaso, pudiéndose observar únicamente en el grupo ${}_2C_s$ un aumento de la actividad a 55 d.e. con respecto a 52 d.e., que coincidió en el tiempo con el pico de mayor actividad observado en los animales inducidos (55d.e.) (Figura 45.A.). Las distintas dietas experimentales, por su parte, ejercieron poca influencia en la actividad de NQO1 en los animales sanos. Así, a 55 y 100 d.e. el grupo ${}_2C_s$ estuvo por encima del ${}_2M_s$ y ${}_2O_s$ (Figura 46)



Figura 46. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad NQO1 y GST en hígado de animales sanos. A. Actividad enzimática en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la actividad en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la actividad a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; ${}_2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; ${}_2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; *: $p \leq 0.05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

La actividad de GST presentó pocas modificaciones a lo largo del estudio y su perfil fue variable. La administración del DMBA prácticamente no modificó dicha actividad, con la excepción de un ligero aumento del orden de 1.3 y 1.4 veces con respecto a 52 d.e. en los grupos ${}_2C_i$ y ${}_2O_i$ a 55 d.e., respectivamente (Figura 45.A y Figura 45.B.). Este aumento fue estadísticamente significativo al comparar las edades de 54 y 55 d.e. dentro de cada grupo (Figura 45.C.). Los 55 d.e. serían, por tanto, el momento de mayor actividad de ambas enzimas de fase II tras la administración del DMBA, y en ambos casos el grupo ${}_2M_i$ presentó valores inferiores con respecto a los otros dos grupos.

En los animales sanos, la actividad GST no varió ni en respuesta a la administración del vehículo ni por efecto de la dieta. Únicamente se observó un aumento significativo en el grupo $2O_s$ respecto a $2C_s$ y $2M_s$ a 100 d.e. (Figura 46).

3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE LAS XMEs POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA.

Con el objetivo de valorar si los cambios observados en la expresión de ARNm de las XMEs por efecto de los lípidos de la dieta respondían a un mecanismo transcripcional, se analizó el grado de activación de los factores de transcripción AhR y Nrf2, a través de la medida de su retención en el citoplasma. El estudio se realizó entre los 52 y 63 d.e., intervalo de tiempo en el que se detectaron los mayores cambios de expresión de las XMEs de fase I y fase II en animales inducidos.

Los resultados del análisis de retención citoplasmática de AhR a 52 d.e. mostraron una menor retención en el grupo $2M_i$ comparado con los grupos $2C_i$ y $2O_i$ (Figura 47.A.). A pesar de la falta de significación estadística, este patrón estaría en consonancia con la mayor expresión de CYP1A1 y CYP1B1 en este grupo a esta misma edad (Figura 39.A.). Además, este perfil de retención citoplasmática a 52 d.e. en la serie experimental 2 fue el mismo que el observado a 51 d.e. en la serie experimental 1 (Figura 33.A.).

Asimismo, la disminución en la retención citoplasmática de AhR entre 52 y 53.5 d.e. (Figura 47.A. y Figura 47.B.) en los grupos $2C_i$ y $2O_i$ podría relacionarse con el mayor aumento de la expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 para estos dos grupos a 53.5 d.e. (Figura 39.A.). Del mismo modo, el aumento de la retención entre los 53.5 y 54 d.e. hallado en los tres grupos experimentales (Figura 47.A. y Figura 47.B.) coincidiría con el inicio de la disminución de los niveles de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1, observado a 54 d.e. en todos los grupos (Figura 39.A.). Además, el patrón de retención citoplasmática a 63 d.e., similar al de 52 d.e., (Figura 47.A.) podría relacionarse con el patrón de expresión de CYP1A1 a esas mismas edades (Figura 39.A.), que correspondería con el retorno a la situación basal y/o previa a la inducción.

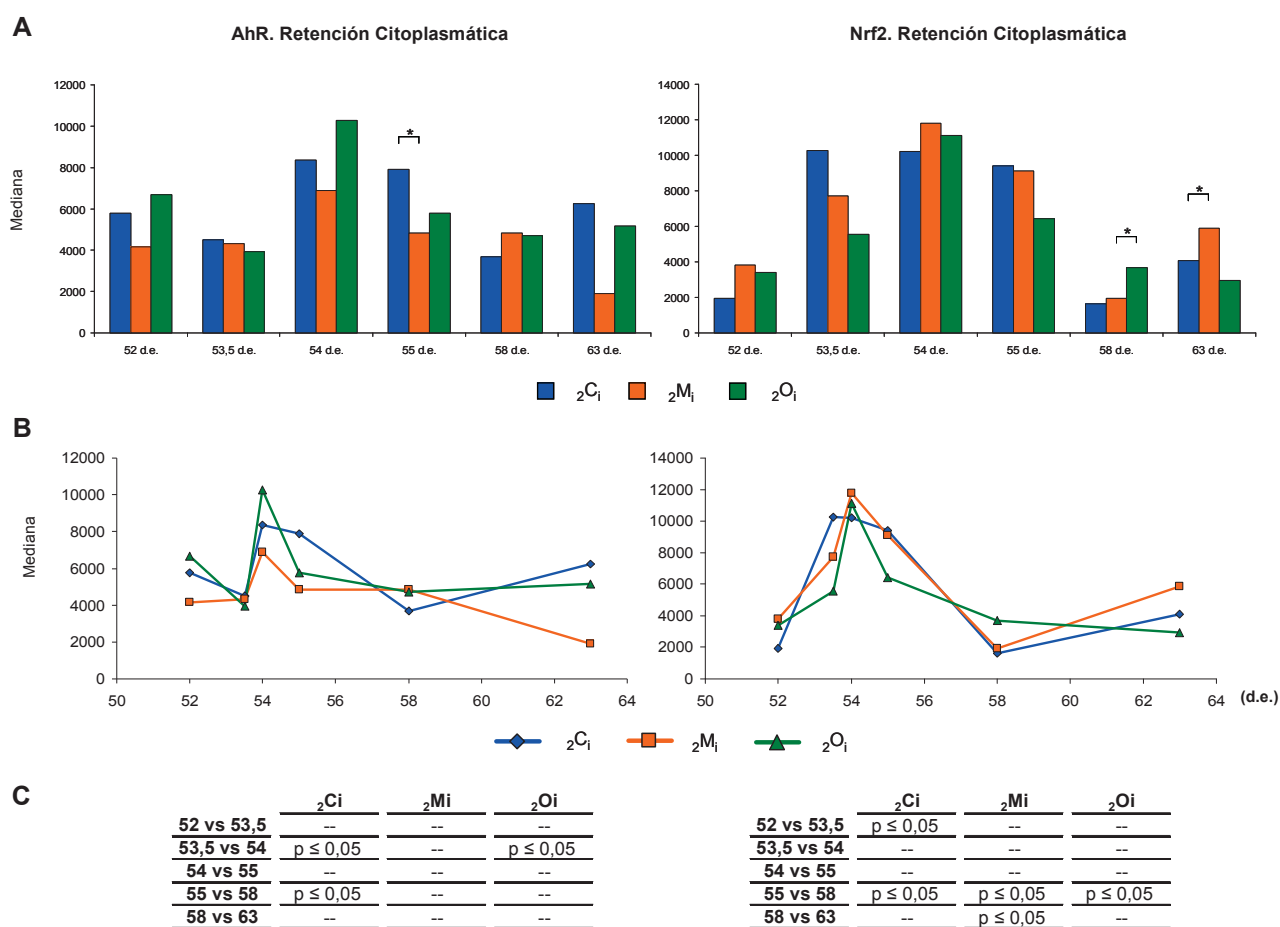


Figura 47. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la retención citoplasmática de AhR y Nrf2 en hígado de animales inducidos con DMBA. A. Retención citoplasmática en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la retención citoplasmática en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios en la retención citoplasmática a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Asimismo se analizaron los niveles de expresión de ARNm de AhR tanto en animales inducidos como en sanos. En ambos casos los grupos experimentales alimentados con dieta rica en aceite de oliva virgen (${}_2O_i$ y ${}_2O_s$) en general presentaron mayores niveles de expresión que los otros grupos (Figura 48.A. y Figura 48.B.). Al comparar la evolución de dicha expresión a lo largo de todo el estudio, mediante el análisis no paramétrico de Friedman, se determinó que la expresión en el grupo ${}_2O_i$ fue mayor que en los grupos ${}_2M_i$ y ${}_2C_i$, de forma estadísticamente significativa entre los 52 y 150 d.e. Además, la expresión en el grupo ${}_2M_i$ fue superior a la de ${}_2C_i$ entre 52 y 150 d.e. En los animales sanos, la mayor expresión de AhR en ${}_2O_s$ respecto a ${}_2M_s$ también fue significativa entre 52 y 150 d.e.

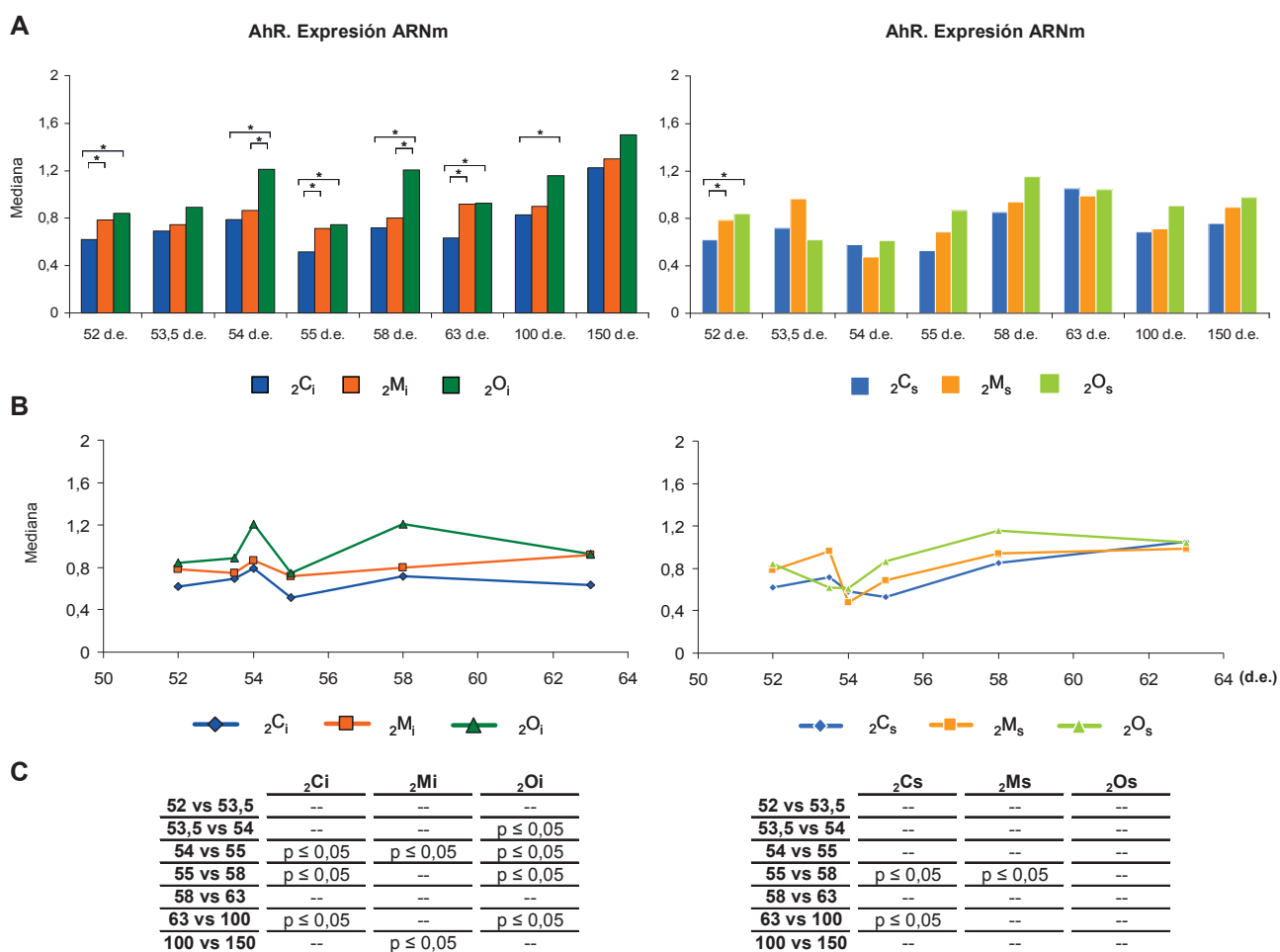


Figura 48. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de AhR en el hígado de los animales inducidos con DMBA (izquierda) y de los animales sanos (derecha). A. Expresión de ARNm en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la expresión de ARNm en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Cuando se compararon los valores de expresión de ARNm de AhR entre animales inducidos y animales sanos se observó que en todos los casos los valores fueron próximos a 1 (Tabla 4), indicando que el DMBA no modificó los niveles de ARNm de AhR.

Respecto al factor de transcripción Nrf2, su retención en citoplasma a 52 d.e. tendió a ser mayor en los grupos de dieta hiperlipídica que en el grupo control (Figura 47.A. y Figura 47.B.) lo que podría relacionarse con la mayor expresión de NQO1 en el grupo ${}_2C$ observada a esta misma edad (Figura 43.A. y Figura 44.A.). Tras la inducción con el DMBA, los niveles

de Nrf2 retenidos en citoplasma aumentaron en todos los grupos experimentales, alcanzando un valor máximo a 54 d.e. para volver a una situación similar a la inicial (52 d.e.) a 58 d.e. (Figura 47.A. y Figura 47.B.). Estos resultados no se corresponderían con los cambios en la expresión de las enzimas de fase II observados en este trabajo (Figura 43.A. y Figura 43.B.). Así, mientras que la expresión de ARNm de GSTP1 presentó mínimos cambios relacionados con la dieta y la administración del DMBA (Figura 43.A.), el perfil de expresión de NQO1 (Figura 43.A.) fue similar al observado para las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 en las edades 53.5, 54 y 55 d.e. (Figura 41.A.), lo que podría relacionarse con la retención citoplasmática de AhR más que con la de Nrf2, para estas edades (Figura 47.A.).

El análisis de los niveles de ARNm de Nrf2 mostró que, de forma similar a lo observado en el caso de la expresión del ARNm de AhR (Figura 48.A. y Figura 48.B.), tanto en animales inducidos como en sanos, los grupos experimentales alimentados con dietas hiperlipídicas en general presentaron mayores niveles de expresión que los alimentados con dieta control (Figura 49.A. y Figura 49.B.). Al comparar la evolución de dicha expresión a lo largo de todo el estudio, mediante el análisis no paramétrico de Friedman, se determinó que en los grupos ${}_2M_i$ y ${}_2O_i$ los niveles de expresión fueron mayores que en el grupo ${}_2C_i$, significativamente entre los 52 y 150 d.e., mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ${}_2M_i$ y ${}_2O_i$. En el caso de los animales sanos, el grupo ${}_2O_s$ presentó mayores niveles de expresión que los grupos ${}_2M_s$ y ${}_2C_s$ entre los 52 y 150 d.e. y los de ${}_2M_i$ fueron significativamente superiores a los de ${}_2C_i$ entre 52 y 63 d.e.

A diferencia de lo ocurrido con AhR, cuando se compararon los valores de expresión de ARNm de Nrf2 entre animales inducidos y animales sanos (Tabla 11), se observó que a 53.5 d.e. se obtuvieron valores entre 1.6 y 2.9 veces en los distintos grupos experimentales y éstos se mantuvieron ligeramente elevados hasta volver a valores próximos a 1 alrededor de los 63 d.e., dependiendo del grupo. Ello podría indicar una ligera inducción de la expresión del ARNm de Nrf2 tras la administración del DMBA.

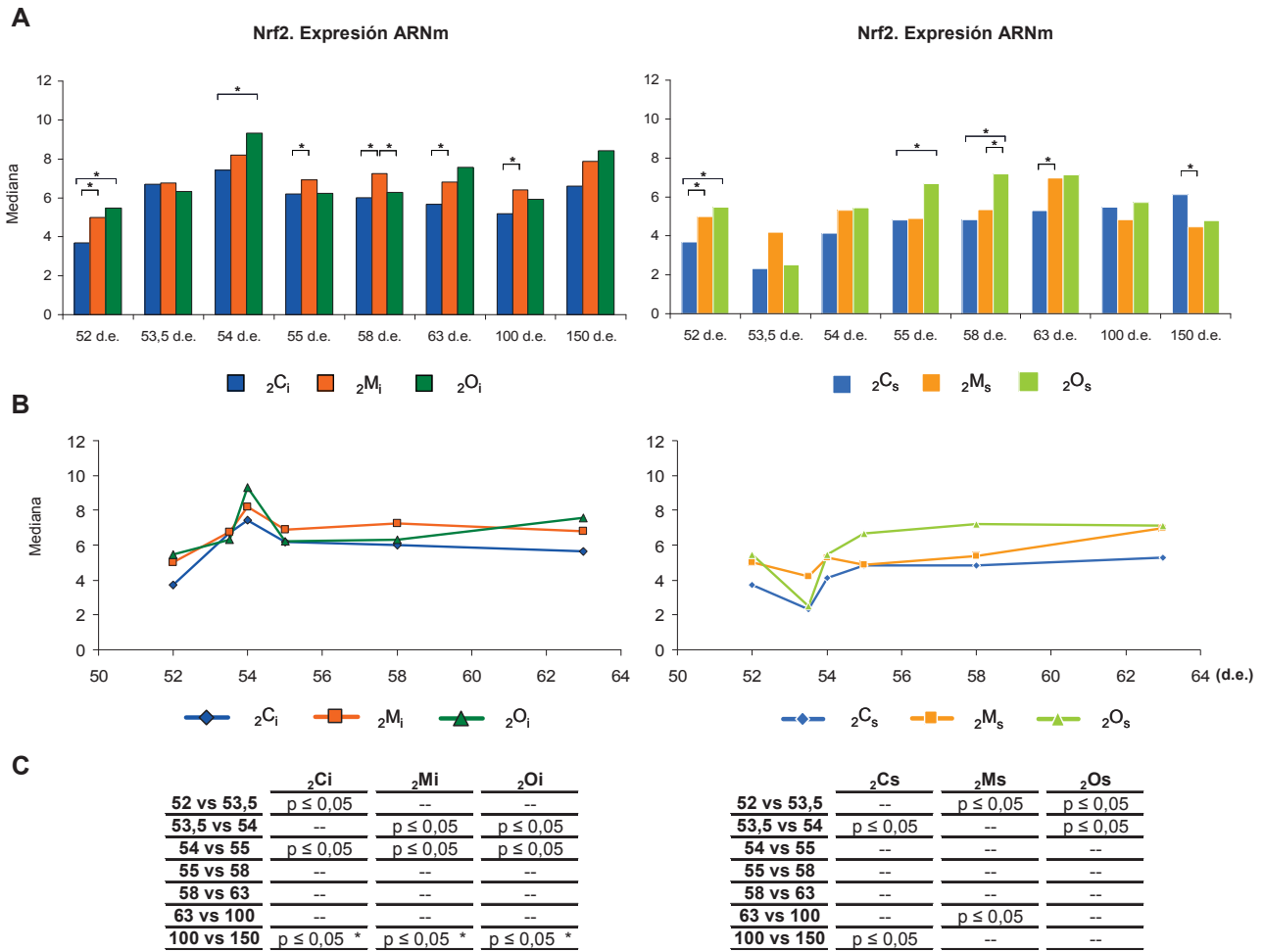


Figura 49. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de ARNm de Nrf2 en hígado de animales inducidos con DMBA (izquierda) y de animales sanos (derecha). A. Expresión de ARNm en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la expresión de ARNm en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 10 días posteriores (63 d.e.). C. Análisis estadístico de los cambios de la expresión de ARNm a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

4. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE METABOLITOS ACTIVOS DEL DMBA.

A fin de comprobar si el efecto diferencial de los lípidos de la dieta sobre el perfil de actividad enzimática de las XMEs observado en hígado tras la administración del DMBA se correspondía con una diferente formación de metabolitos activos, se determinaron en plasma los niveles de DMBA total así como los de algunos de los principales metabolitos detectables, representativos de la acción hepática de los CYP1s.

Debido a la complejidad de las técnicas utilizadas para su determinación, a los escasos trabajos previos sobre la detección de los diversos compuestos en ensayos *in vivo*, a la limitación del número de muestras analizadas por temas tanto metodológicos como de practicabilidad, a las bajas concentraciones de los diversos compuestos en plasma, los resultados presentados aquí (Figura 50), a pesar de tener escasas significaciones estadísticas, deben ser considerados como un primer abordaje al tema. Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con los datos de actividad de las XMEs. Así, a las 12 horas post-inducción el grupo de dieta de aceite de maíz presentó los niveles más bajos de DMBA en plasma comparado con los otros dos grupos y además, esto se acompañó de niveles mayores de todos los metabolitos analizados (3-OH-DMBA, 3,4-diOH-DMBA y 12-OH-Me-7-MBA) en este grupo experimental (Figura 50.A.). Estos resultados estarían de acuerdo con la mayor actividad EROD observada en este grupo experimental a las 12 horas post-inducción (Figura 41.A.). Además, los niveles de DMBA en plasma disminuyeron más rápidamente en el grupo $2M_i$ comparado con los otros dos grupos, observándose que a partir de las 48 horas post-inducción los niveles de DMBA en este grupo fueron mucho más bajos que en los grupos $2C_i$ y $2O_i$. Esta rápida disminución del DMBA se acompañó de mayores niveles de metabolitos, en especial de 3,4-diOH-DMBA, precursor de los diolepóxidos altamente reactivos (Figura 50.A.). Por otro lado, los grupos de dieta de aceite de oliva y control mostraron una disminución de los niveles plasmáticos de DMBA más paulatina junto a un incremento de la actividad EROD más progresivo en comparación con el del grupo de aceite de maíz. Además, en el grupo control los niveles de metabolitos activos fueron inferiores en todas las horas post-inducción estudiadas posiblemente debido a una mayor actividad NQO1 (Figura 43.A.) y una mejor coordinación de las actividades fase I/fase II en este grupo comparado con los de dieta hiperlipídica. Por su parte, el grupo de dieta de aceite de oliva, presentó una situación intermedia entre los otros dos grupos. Así, los niveles plasmáticos de DMBA disminuyeron

de forma más rápida que en el caso del grupo control, pero más lentamente que en el grupo de aceite de maíz. Del mismo modo, los niveles de metabolitos del DMBA fueron en todos los casos superiores a los del grupo control.

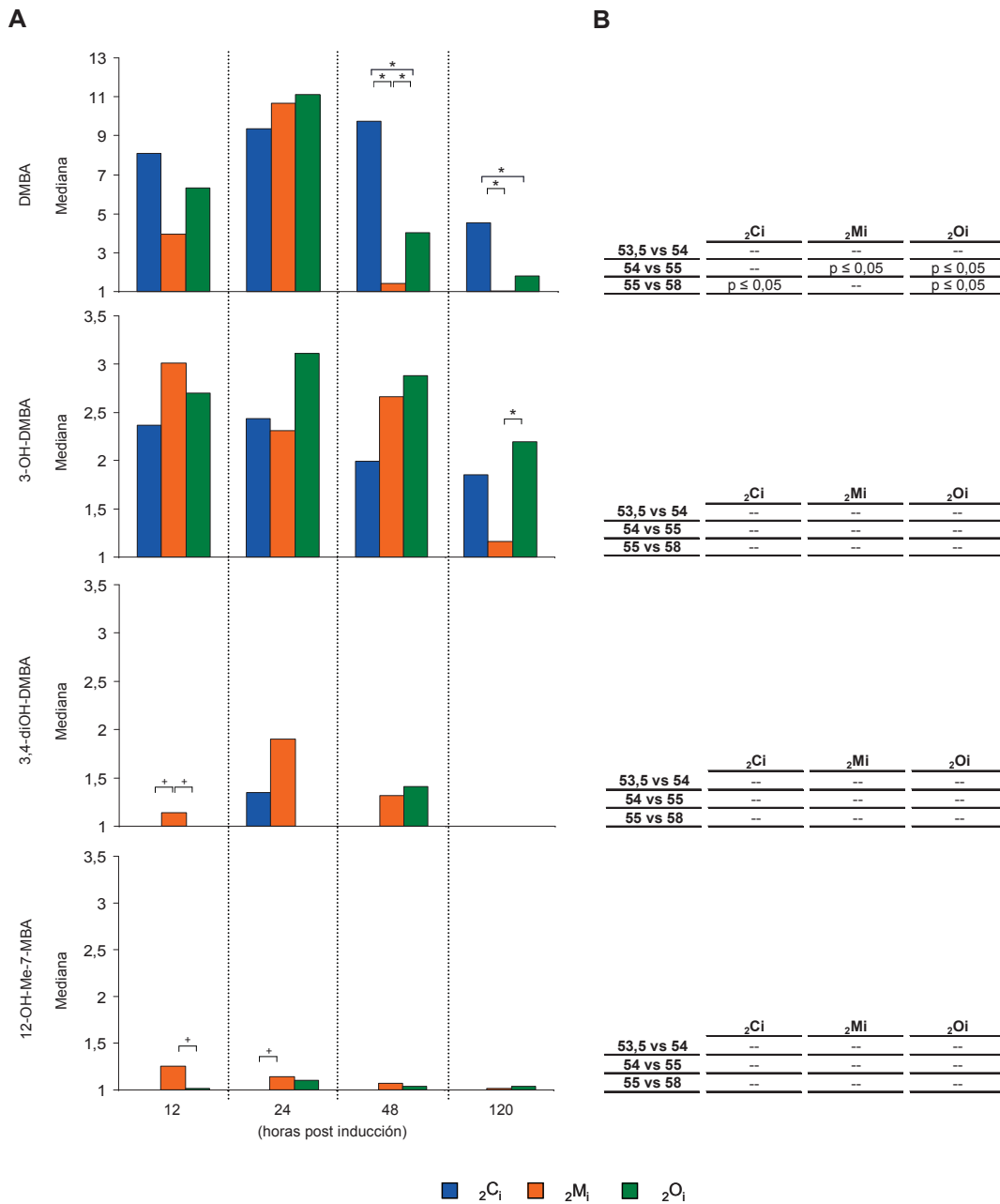


Figura 50. Determinación de los niveles de DMBA y de sus principales metabolitos en plasma de animales inducidos. A. De arriba abajo, niveles relativos en plasma de DMBA, 3-OH-DMBA, 3,4-diOH-DMBA y 12-OH-Me-7-MBA. Los niveles plasmáticos fueron expresados en tanto por uno en comparación con los valores inespecíficos observados en los controles negativos. B. Análisis estadístico de los niveles plasmáticos a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas, de arriba abajo DMBA, 3-OH-DMBA, 3,4-diOH-DMBA, 12-OH-Me-7-MBA. Los valores corresponden a las edades desde los 52 d.e. hasta los 58 d.e., correspondientes desde las 12 hasta las 120 horas post-inducción. d.e.: días de edad; ₂Ci; grupo control inducido de la serie experimental 2; ₂Mi; grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ₂Oi; grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: p≤0.05; +: 0.1>p<0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Por otra parte, de los resultados obtenidos con la técnica utilizada, se determinó que el 7-OH-Me-12-MBA no se pudo detectar en plasma. Además, los perfiles de cromatografía indicaron que se produjeron otros posibles compuestos monohidroxilados derivados de la metabolización del DMBA por parte de las CYP1s. Estos podrían ser analizados con la utilización de nuevos patrones (Figura 51). Por lo tanto, resultados más completos podrían ser obtenidos en un futuro con la optimización de esta técnica.

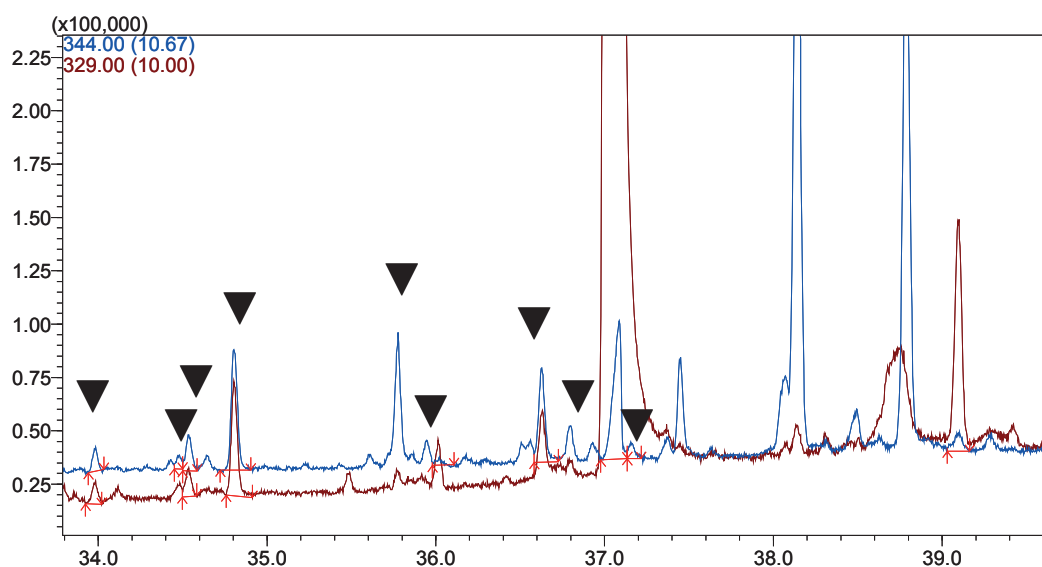


Figura 51. Picos cromatográficos que presentan los iones m/z 344 y m/z 329. Éstos podrían corresponder a otros metabolitos monohidroxilados del DMBA (peso molecular del derivado TMS 344uma).

5. DAÑO EN EL ADN: FORMACIÓN DE ADUCTOS DMBA-ADN EN GLÁNDULA MAMARIA.

El efecto de los lípidos de la dieta sobre el metabolismo del DMBA también fue valorado a través de la determinación del daño en el ADN por formación de aductos entre los metabolitos activos del DMBA y el ADN en glándula mamaria.

Los resultados, representados en la Figura 52, demostraron que los mayores niveles de daño en el ADN tras la administración del DMBA se produjeron en el grupo $2M_i$ en todas las edades estudiadas. Además, el mayor número de aductos 24 horas post inducción en el grupo $2M_i$ (Figura 52 y Figura 53) se correspondió con la mayor actividad EROD en este grupo observada a las 12 horas post inducción (53.5 d.e.) (Figura 41). Ello sería compatible con un retraso entre la rápida formación de metabolitos activos en el hígado, la detección en plasma de los mayores niveles de metabolitos en este grupo entre las 12 y las 24 horas post-inducción, en especial del 3,4-diOH-DMBA, y su llegada y consiguiente formación de daño en el tejido diana a partir de las 24 horas post-inducción. Así, el patrón de actividad EROD a 53.5 d.e. en hígado (Figura 40.A.) se correspondió con el patrón de daño en el ADN observado a 54, 55 y 58 d.e. en glándula mamaria (Figura 52). A pesar de que la actividad EROD disminuyó rápidamente en el grupo $2M_i$ tras las primeras 12 horas, los niveles de aductos en este grupo se mantuvieron siempre por encima de los de los demás grupos.

Es interesante destacar que al comparar los niveles de daño en el ADN entre los grupos $2C_i$ y $2O_i$ a 53.5 d.e. el grupo $2O_i$ presentó niveles inferiores al grupo $2C_i$. Sin embargo, esta situación no se mantuvo en las siguientes edades, de manera que a 55 d.e. (Figuras 52 y 54) y 58 d.e. el grupo $2C_i$ fue el que presentó los niveles más bajos de aductos en glándula mamaria (Figura 52).

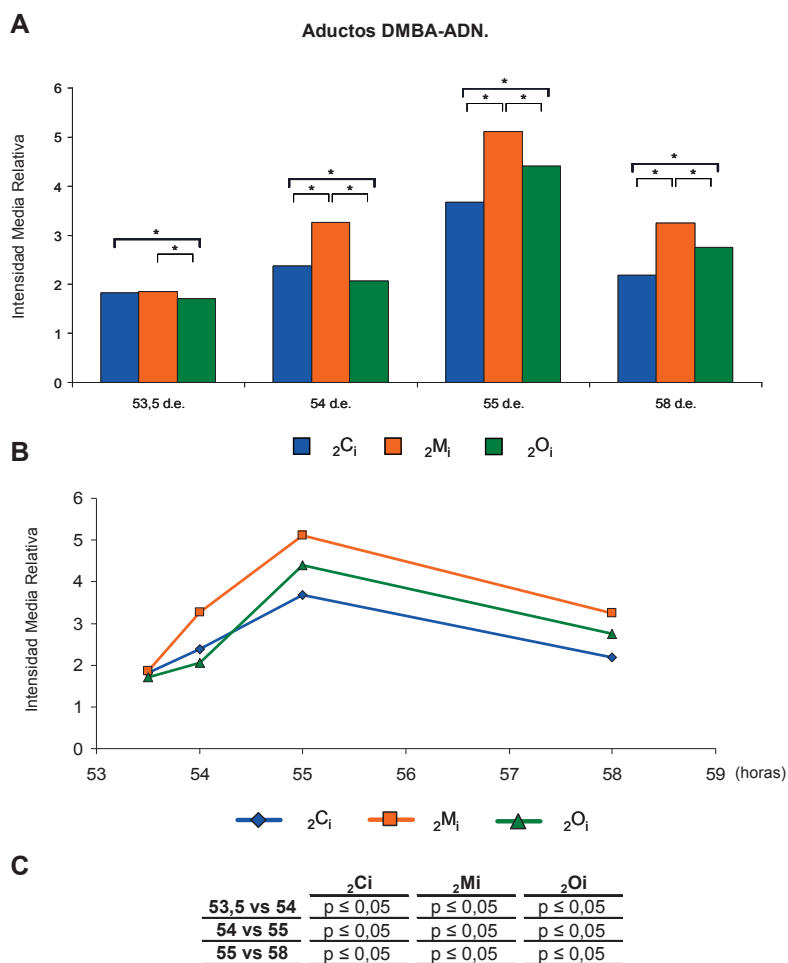


Figura 52. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la formación de aductos DMBA-ADN en glándula mamaria de animales inducidos. A. Niveles de aductos en los diferentes grupos experimentales a todas las edades estudiadas. B. Evolución de la formación de aductos en cada uno de los grupos experimentales desde las 24 horas previas a la administración del carcinógeno (52 d.e.) hasta los 5 días posteriores (58 d.e.). C. Análisis estadístico de la formación de aductos a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales entre edades sucesivas. d.e.: días de edad; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2; *: $p \leq 0,05$, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

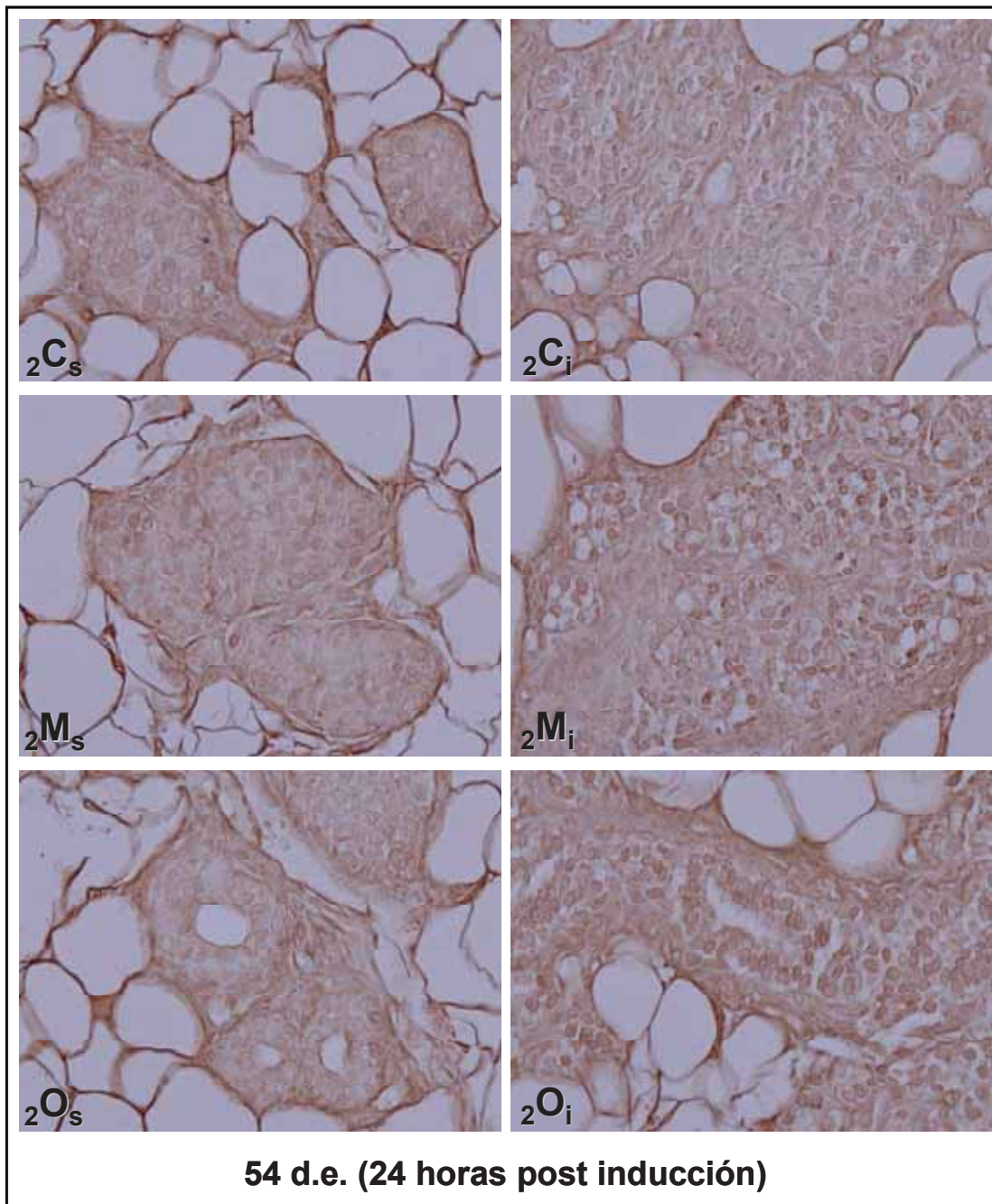


Figura 53. Detección de aductos DMBA-ADN en glándula mamaria 24 horas después de la administración del carcinógeno en los diferentes grupos experimentales. Imagen representativa de inmunohistoquímica. d.e.: días de edad; 2Cs: grupo control sano de la serie experimental 2; 2Ci: grupo control inducido de la serie experimental 2; 2Ms: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; 2Mi: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; 2Os: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; 2Oi: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

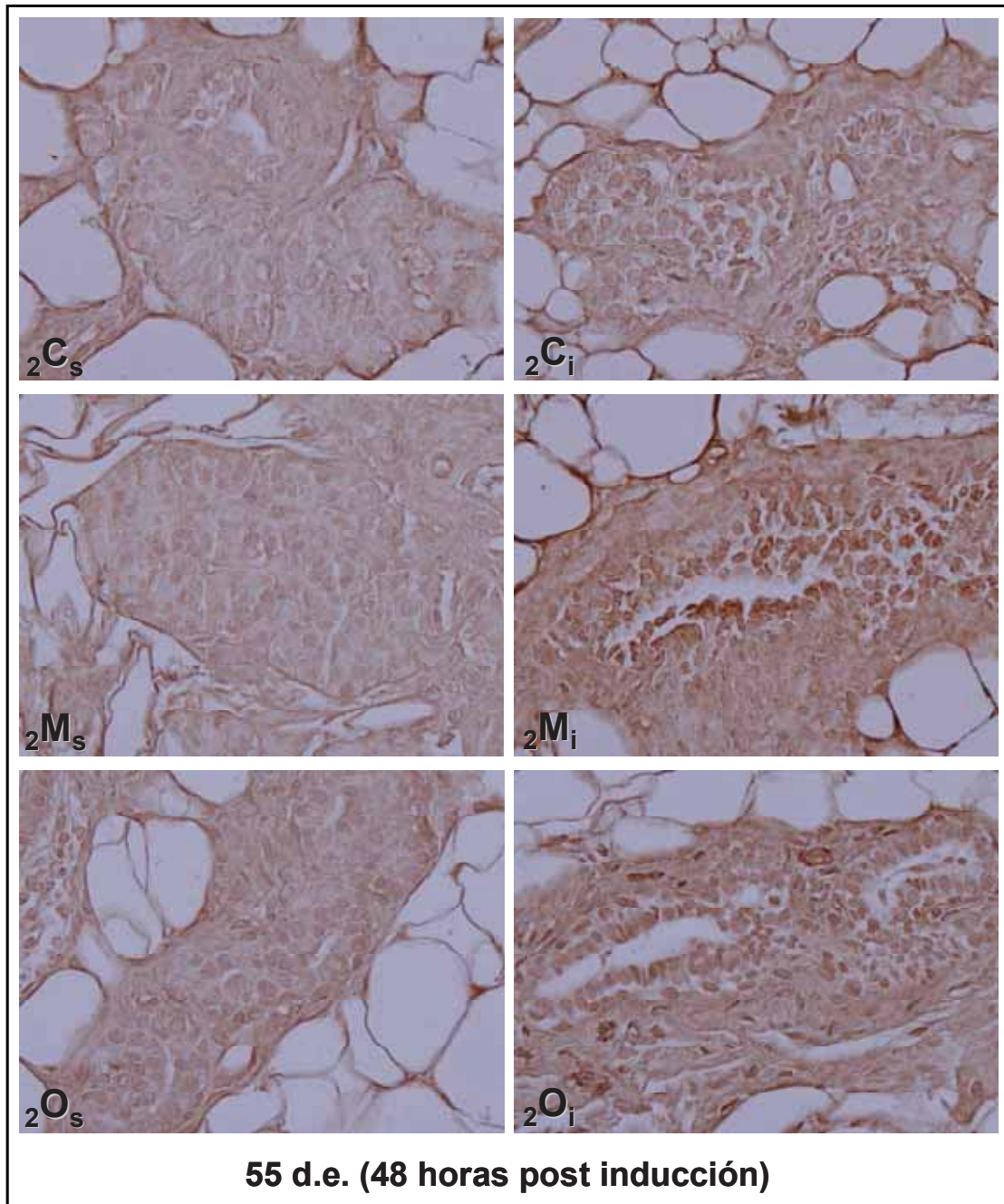


Figura 54. Detección de aductos DMBA-ADN en glándula mamaria 48 horas después de la administración del carcinógeno en los diferentes grupos experimentales. Imagen representativa de inmunohistoquímica. d.e.: días de edad; 2Cs: grupo control sano de la serie experimental 2; 2Ci: grupo control inducido de la serie experimental 2; 2Ms: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; 2Mi: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; 2Os: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; 2Oi: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

D. PARAMETROS DE LA CARCINOGENESIS.

1. SERIE EXPERIMENTAL 1.

1.1 PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.

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

Las afecciones mamarias se clasificaron en función de los distintos tipos histológicos como patología maligna (Figura 55) y benigna. Dentro de la patología mamaria benigna se consideraron diferentes tipos de lesiones, ya que algunas de ellas pueden evolucionar desfavorablemente (Tabla 13). Asimismo, también se encontraron carcinomas escamosos, como patología neoplásica no mamaria maligna, en los distintos grupos experimentales: 2 en $1C_i$, 1 en $1M_i$ y 8 en $1O_i$.

Tabla 13. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio en la serie experimental 1.

	$1C_i$	$1M_i$	$1O_i$
PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA MALIGNA			
Adenocarcinomas	46	100	58
PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA BENIGNA			
Neoplásica			
Adenoma	1	4	7
Fibroma	2	2	1
Fibroadenoma	1	9	6
Otras			
<i>Papiloma</i>	1	1	-
<i>Lipoma</i>	-	1	-
<i>Fibrolipoma</i>	-	1	-
<i>Hemangioma</i>	1	-	-
<i>Linfangioma</i>	-	-	-
Otras lesiones			
Quísticas			
<i>Ductal</i>	-	-	2
<i>Epidérmica</i>	2	5	-
No quísticas			
<i>Hiperplasia lobulillar</i>	1	5	2
<i>Mastopatía</i>	1	1	-
<i>Fibrosis</i>	-	-	1

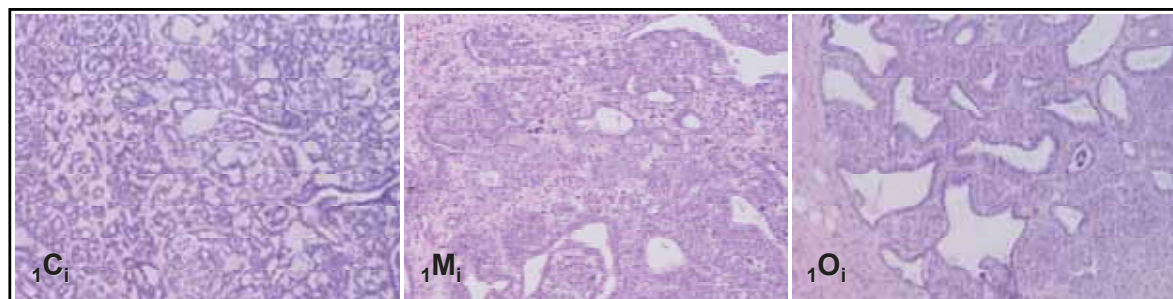


Figura 55. Imágenes histopatológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. Aumento 200X. $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1.

1.2. TIEMPO DE LATENCIA.

El análisis del tiempo de latencia de los tumores se caracterizó de tres formas diferentes. En primer lugar, se consideró el tiempo de aparición del primer tumor del grupo. Éste fue menor en el grupo $1M_i$ seguido del $1O_i$ y finalmente del $1C_i$ (Tabla 14).

Tabla 14. Tiempo de aparición del primer tumor en los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

	$1C_i$	$1M_i$	$1O_i$
t	52	20	33
N	6	1	3

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

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

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

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

Los resultados mostraron el mismo orden de aparición de tumores en los grupos que en el enfoque anterior aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 15 y Tabla 16).

Tabla 15. Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

	${}_1C_i$	${}_1M_i$	${}_1O_i$
n	16	20	15
M	98,6	81,8	86,4
m	97	71,5	89
DE	47,8	44,2	40,04
CV	203	161,8	222,3

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

Tabla 16. Análisis estadístico del tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

Grupos comparados	Z	Significación
${}_1C_i/{}_1M_i$	1,198	NS
${}_1C_i/{}_1O_i$	0,496	NS
${}_1M_i/{}_1O_i$	0,635	NS

Z: U de Mann-Whitney. NS: diferencias no significativas.

Finalmente, se analizó la distribución en el tiempo de los animales afectados dentro de un mismo grupo experimental, agrupando las palpaciones por clases en función del tiempo de la primera aparición de tumores mamarios malignos en cada rata (1 clase = 4 palpaciones). En las Tablas 17 y 18 se muestran los resultados del estudio cualitativo, que no reveló diferencias significativas entre grupos.

Tabla 17. Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

Clases	I (P1-P4)	II (P5-P8)	III (P9-P12)	IV (P13-P16)	V (P17-P20)	VI (P21-P24)	VII (P25-P27)
${}_1C_i$	0 (0%)	5 (31,3%)	2 (12,5%)	6 (37,5%)	0 (0%)	1 (6,3%)	2 (12,5%)
${}_1M_i$	3 (15%)	4 (20%)	7 (35%)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
${}_1O_i$	1 (6,7%)	4 (26,7%)	3 (20%)	6 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,7%)

P: palpación.

Tabla 18. Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

Grupos comparados	χ^2 Observada	χ^2 Teórica	Sginificación
${}_1C_i/{}_1M_i$	8	12,59	NS
${}_1C_i/{}_1O_i$	3	12,59	NS
${}_1M_i/{}_1O_i$	5	12,59	NS

χ^2 : test de la ji-cuadrado. NS: diferencias no significativas.

1.3. INCIDENCIA.

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

Tal y como se muestra en la Figura 56, la incidencia de animales afectados aumentó durante el estudio en todos los grupos experimentales. Desde el punto de vista cualitativo, la evolución del parámetro mostró que la curva del grupo ${}_1M_i$ fue paralela a las de los grupos ${}_1C_i$ y ${}_1O_i$. Mientras la incidencia del grupo ${}_1M_i$ se mantuvo por encima del resto de grupos durante todo el estudio, los valores del grupo ${}_1O_i$ fluctuaron alrededor del control. Cuantitativamente, el porcentaje de animales afectados fue significativamente superior en el grupo ${}_1M_i$ con respecto a los otros dos, los cuales mostraron valores similares entre sí (Tabla 18).

En el momento del sacrificio, los porcentajes de incidencia fueron los siguientes: ${}_1C_i$, 80% (16 animales de 20); ${}_1M_i$, 100 % (20 animales de 20) y ${}_1O_i$, 75% (15 animales de 20).

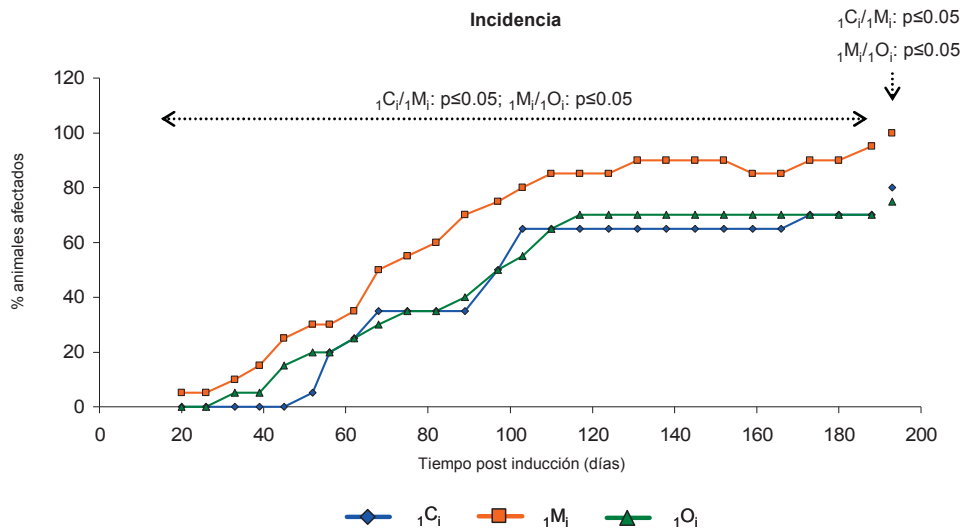


Figura 56. Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

1.4. CONTENIDO TUMORAL.

El estudio del contenido tumoral se realizó utilizando dos parámetros: el contenido tumoral total y el contenido tumoral medio.

- Contenido tumoral total (Tj)

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

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

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

El parámetro T puede tener el mismo valor en grupos con distinta incidencia, por lo que la información que proporciona es parcial. En consecuencia, a fin de realizar una

aproximación lo más precisa posible, se estudió dicho parámetro junto con el contenido tumoral medio (K_j) que se explicará a continuación.

El contenido tumoral total aumentó en todos los grupos a lo largo del ensayo (Figura 57). Durante todo el estudio, el grupo $1M_i$ presentó un número total de tumores significativamente superior al del resto de grupos experimentales. En cambio el grupo $1O_i$ presento valores intermedios, significativamente superiores al grupo $1C_i$ e inferiores al $1M_i$. Ambos grupos ($1O_i$ y $1C_i$) tendieron a la estabilización del contenido tumoral a partir de los 125 d.e. aproximadamente.

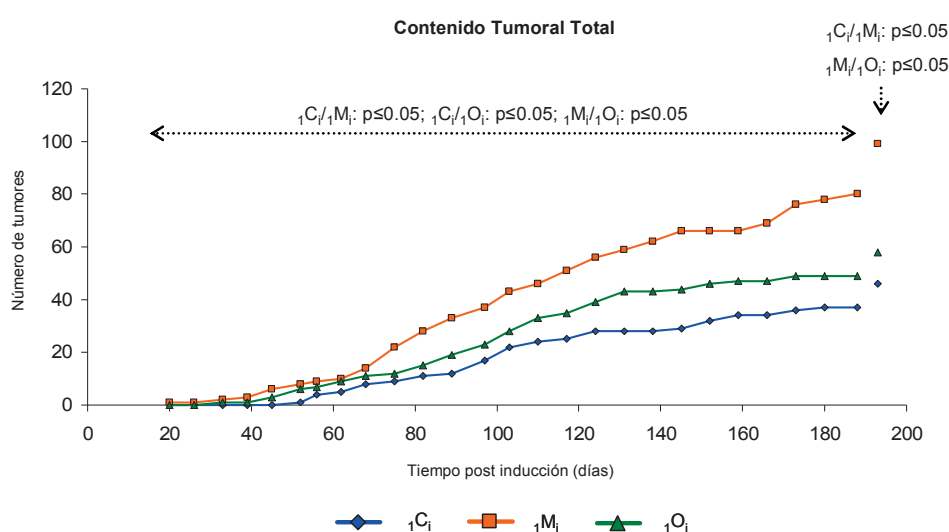


Figura 57. Contenido tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

En el momento del sacrificio se detectaron diferencias significativas entre el grupo $1M_i$ y los otros dos grupos. El número total de tumores obtenidos al final del estudio para cada grupo fue: 46 en $1C_i$, 100 en $1M_i$ y 58 en $1O_i$.

- Contenido Tumoral Medio (K_j)

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

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

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

El valor medio K constituye un parámetro indicativo de la cantidad de tumores, respecto al tiempo, que podría esperarse que tuviera una rata que ha contraído la enfermedad cancerosa por el hecho de pertenecer a un grupo experimental determinado. Dicho parámetro presenta el inconveniente de estar afectado por la dinámica de aparición de tumores en animales no afectados anteriormente, y por tanto sufrir fluctuaciones importantes palpaciones. Por ese motivo, y por los expuestos anteriormente en el contenido tumoral total (T_j), se estudiaron ambos parámetros para tener una idea integral del contenido tumoral.

Los resultados mostraron que el contenido tumoral medio aumentó a lo largo del tiempo en todos los grupos experimentales, pero el grupo control mostró una línea de evolución estadísticamente inferior a los grupos de dieta hiperlipídica (Figura 58). Tal y como se observó con el contenido tumoral total, el grupo ₁M_i presentó los mayores niveles de contenido tumoral medio seguido del grupo ₁O_i y ₁C_i, siendo todas las comparaciones estadísticamente significativas. Al final del ensayo únicamente las diferencias entre el grupo ₁M_i y el grupo ₁C_i fueron estadísticamente significativas.

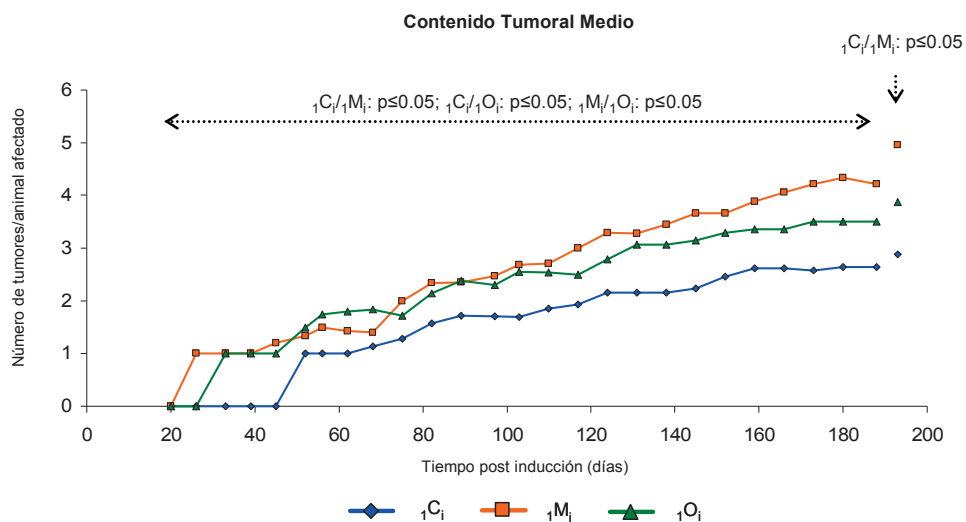


Figura 58. Contenido tumoral medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

1.5. VOLUMEN TUMORAL.

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

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

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

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

- Volumen tumoral total (V)

La expresión matemática del volumen tumoral total es la siguiente:

Si "K_a" es el número de tumores de un animal "a", el volumen tumoral total "V" de ese animal vendrá expresado por:

$$v_a = \sum_{i=1}^{k_a} V1_i \quad (\text{c.c.})$$

Si “n” es el número de ratas afectadas de un grupo experimental que existen en una palpación “j” del ensayo, el volumen tumoral total del grupo -V_j- se define como:

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

En el momento del sacrificio no se puede analizar estadísticamente este parámetro porque solo existe un dato por grupo. Sin embargo, la utilización de este parámetro se justifica por el hecho de ser independiente de la incidencia y, por tanto, estar libre de oscilaciones debidas a los animales que debutan con tumores.

El análisis de las curvas obtenidas para el volumen tumoral total mostró que el grupo ₁C_i presentó valores inferiores a los otros dos grupos, mientras que entre los grupos de dieta hiperlipídica no se encontraron diferencias significativas (Figura 59). Así, en el sacrificio final los resultados del volumen (c.c.) fueron los siguientes: 69.3 c.c. en ₁C_i, 105 c.c. en ₁M_i y 121.9 para ₁O_i.

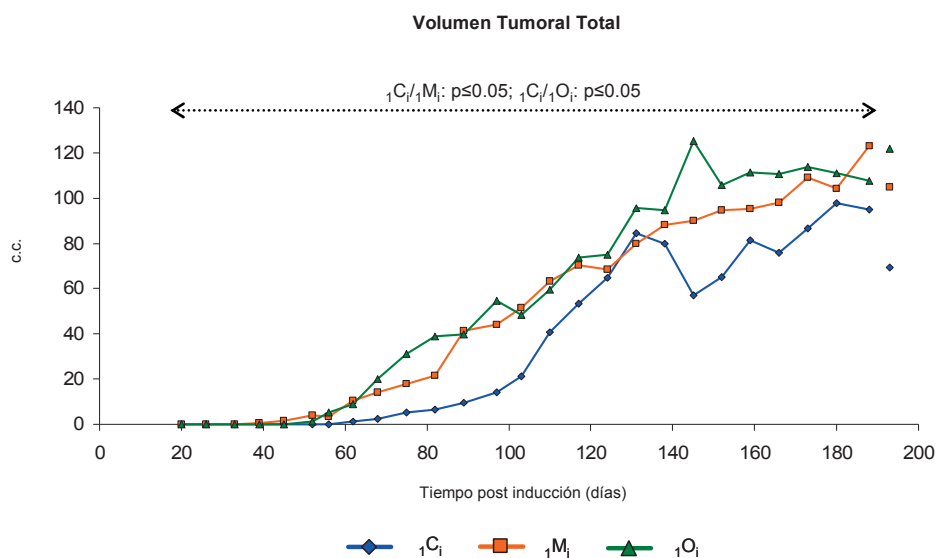


Figura 59. Volumen tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

- Volumen tumoral medio por animal (V_A)

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

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

Los valores de V_A aumentaron, en general, en todos los grupos experimentales a lo largo del ensayo (Figura 60), siendo el grupo $1C_i$ el que presentó de forma estadísticamente significativa los niveles más bajos, en comparación con los otros dos grupos.

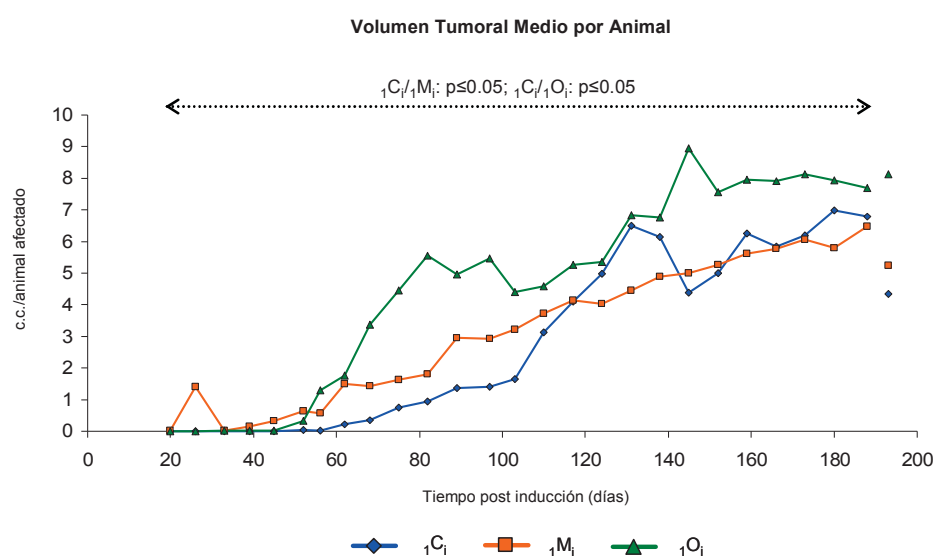


Figura 60. Volumen tumoral medio por animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

- Volumen medio por tumor (V_K)

El volumen medio por tumor del grupo vendrá dado por:

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

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

Debido a las características de este parámetro, que tal y como se comentó en el caso del contenido tumoral medio se ve afectado por la aparición de nuevo tumores de volumen pequeño, el volumen medio por tumor presentó bastantes fluctuaciones (Figura 61). Sin embargo, en general se observó que el grupo $1M_i$ presentó valores significativamente inferiores a los otros dos grupos. En el momento del sacrificio el grupo $1M_i$ también presentó un volumen medio por tumor significativamente inferior a los otros dos grupos.

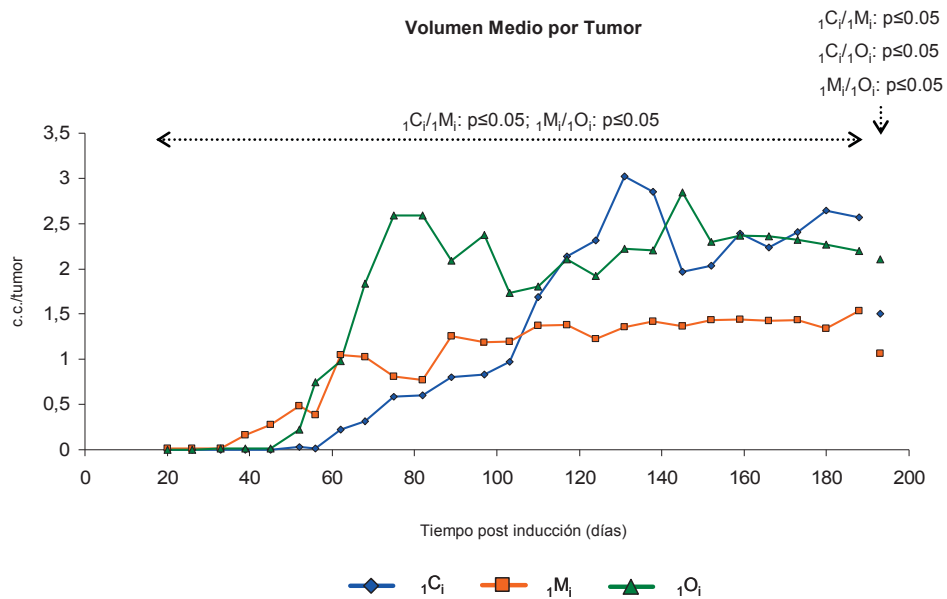


Figura 61. Volumen medio por tumor de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 1.

2. SERIE EXPERIMENTAL 2.

La carcinogénesis de la serie experimental 2 se analizó del mismo modo que la de la serie 1, determinándose los mismos parámetros y analizándose de igual manera.

2.1 PATOLOGÍA DE LAS LESIONES MAMARIAS OBSERVADAS. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.

Las afecciones mamarias se clasificaron como patología maligna y benigna. En el primer caso, ésta consistió en adenocarcinomas (Figura 62). Dentro de la patología mamaria benigna se diagnosticaron diferentes tipos de lesiones. Cabe destacar que el número de tales lesiones benignas fue inferior en la serie 2 que en la serie 1, mientras que el número total de adenocarcinomas fue mayor en la serie 2. Por otra parte, también cabe destacar que en dicha serie no se encontraron carcinomas escamosos (patología neoplásica no mamaria maligna) (Tabla 19).

Tabla 19. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio en la serie experimental 2.

	${}_2C_i$	${}_2M_i$	${}_2O_i$
PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA MALIGNA			
Adenocarcinomas	44	107	86
PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA BENIGNA			
Neoplásica			
Adenoma	-	1	-
Fibroma	-	-	-
Fibroadenoma	2	9	3
Otras			
<i>Papiloma</i>	2	-	2
<i>Lipoma</i>	-	-	-
<i>Fibrolipoma</i>	-	-	-
<i>Hemangioma</i>	-	-	-
<i>Linfangioma</i>	-	-	-
Otras lesiones			
Quísticas			
<i>Ductal</i>	-	-	-
<i>Epidérmica</i>	1	1	3
No quísticas			
<i>Hiperplasia lobulillar</i>	2	2	-
<i>Mastopatía</i>	-	-	-
<i>Fibrosis</i>	-	-	-

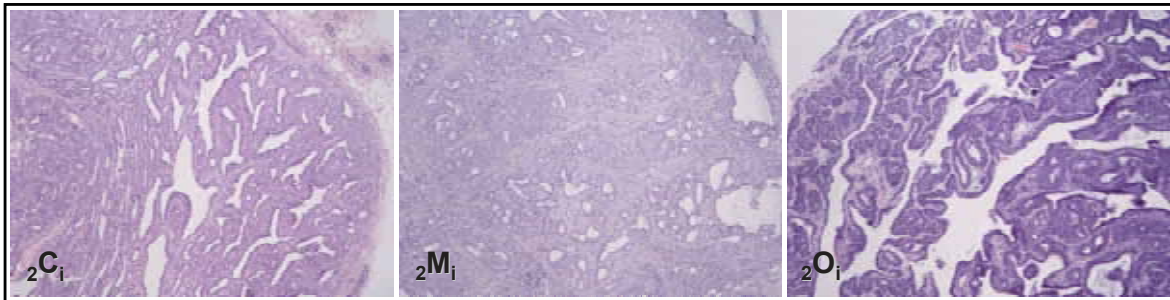


Figura 62. Imágenes histopatológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. Aumento 200X. ${}_{2}C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_{2}M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_{2}O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

2.2. TIEMPO DE LATENCIA.

El tiempo de aparición del primer tumor de cada grupo (Tabla 20) en esta serie experimental 2 fue el mismo en los tres casos. Así, en los tres grupos experimentales el primer tumor se detectó a los 28 días de la administración del carcinógeno.

Tabla 20. Tiempo de aparición del primer tumor en los distintos grupos experimentales. Serie experimental 2.

	${}_{2}C_i$	${}_{2}M_i$	${}_{2}O_i$
t	28	28	28
N	3	3	3

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

Al determinar el tiempo medio de latencia de los tumores para cada grupo (Tabla 21), se observó que el grupo ${}_{2}M_i$ presentó un tiempo medio inferior al del resto de grupos, seguido por el grupo ${}_{2}O_i$ y finalmente por ${}_{2}C_i$. De forma similar a lo observado en la serie experimental 1, las diferencias observadas tampoco fueron estadísticamente significativas (Tabla 22).

Tabla 21. Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

	${}_2C_i$	${}_2M_i$	${}_2O_i$
n	9	10	10
M	60	45	47
m	53	42,3	49,7
DE	15,2	10,0	15,0
CV	28,8	23,6	30,3

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

Tabla 22. Análisis estadístico del tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

Grupos comparados	Z	Significación
${}_2C_i/{}_2M_i$	1,611	NS
${}_2C_i/{}_2O_i$	0,536	NS
${}_2M_i/{}_2O_i$	0,283	NS

Z: U de Mann-Whitney. NS: diferencias no significativas.

Finalmente, el estudio del tiempo de latencia contempló el análisis de la distribución en el tiempo de los animales afectados dentro de un mismo grupo experimental. Para ello se agruparon las palpaciones por clases en función del tiempo de la primera aparición de tumores mamarios malignos en cada rata (1 clase = 3 palpaciones) (Tabla 23). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre grupos (Tabla 24).

Tabla 23. Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

Clases	I (P1-P3)	II (P4-P6)	III (P7-P9)	IV (P10-P12)	V (P13-P15)
${}_2C_i$	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	4 (40%)	0 (0%)
${}_2M_i$	2 (20%)	2 (20%)	5 (50%)	1 (10%)	0 (0%)
${}_2O_i$	1 (10%)	2 (20%)	5 (50%)	2 (20%)	0 (0%)

P: palpación.

Tabla 24. Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

Grupos comparados	χ^2 Observada	χ^2 Teórica	Sginificación
${}_2C_i/{}_2M_i$	3,38	9,49	NS
${}_2C_i/{}_2O_i$	1,91	9,49	NS
${}_2M_i/{}_2O_i$	0,67	9,49	NS

χ^2 : test de la ji-cuadrado. NS: diferencias no significativas.

2.3. INCIDENCIA.

La incidencia de animales afectados aumentó durante todo el estudio en todos los grupos experimentales, al igual que sucedió en la serie 1 (Figura 63). Los valores del grupo ${}_2M_i$ estuvieron por encima de los de los otros dos grupos durante prácticamente todo el estudio, siendo estadísticamente significativas las diferencias con ellos. El grupo ${}_2O_i$, por su parte, presentó valores de incidencia intermedios entre el grupo ${}_2M_i$ y ${}_2C_i$, siendo también significativas la diferencias con el grupo ${}_2C_i$.

En el momento del sacrificio, los porcentajes de incidencia fueron los siguientes: ${}_2C_i$, 90% (9 animales de 10); ${}_2M_i$, 100% (10 animales de 10) y ${}_2O_i$, 100% (10 animales de 10).

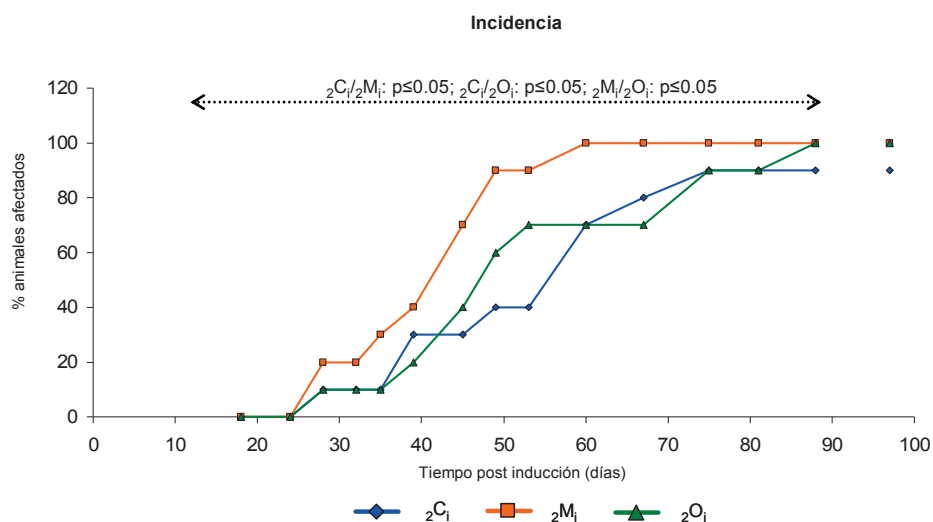


Figura 63. Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

2.4. CONTENIDO TUMORAL.

El estudio del contenido tumoral se realizó a través de los parámetros de contenido tumoral total y contenido tumoral medio.

- Contenido tumoral total (Tj)

El contenido tumoral total aumentó en todos los grupos a lo largo del ensayo (Figura 64), siendo el grupo ${}_2M_i$ el que presentó un número total de tumores superior, seguido del grupo ${}_2O_i$ y del ${}_2C_i$. Las diferencias a lo largo del estudio fueron estadísticamente significativas para todas las comparaciones. Cabe destacar que en esta serie 2 no se observó la estabilización de este parámetro en ningún grupo experimental. Al final del estudio el número total de tumores obtenidos para cada grupo fue: 44 en ${}_2C_i$, 107 en ${}_2M_i$ y 86 en ${}_2O_i$. Las diferencias entre el grupo ${}_2C_i$ y los otros dos grupos fueron estadísticamente significativas.

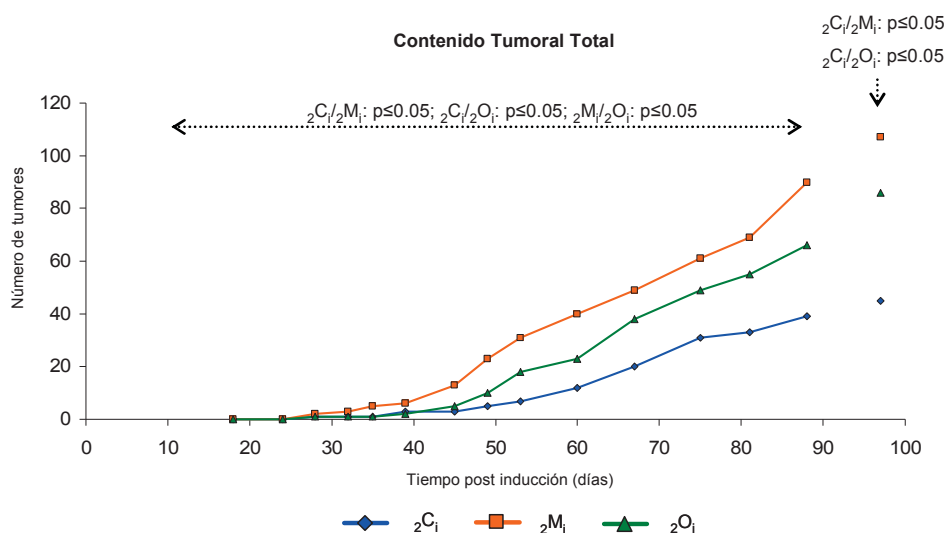


Figura 64. Contenido tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

- Contenido Tumoral Medio (Kj)

El contenido tumoral medio también aumento a lo largo de todo el estudio en todos los grupos experimentales. El grupo ${}_2M_i$ presentó valores significativamente superiores a los de los otros dos grupos (Figura 65). Mientras que el grupo ${}_2O_i$ mostró una situación intermedia entre el grupo ${}_2M_i$ y el ${}_2C_i$, siendo significativas las diferencias con ambos. Por su parte, el

grupo $2C_i$ presento los valores más bajos. Las diferencias observadas al final del ensayo no presentaron diferencias significativas.

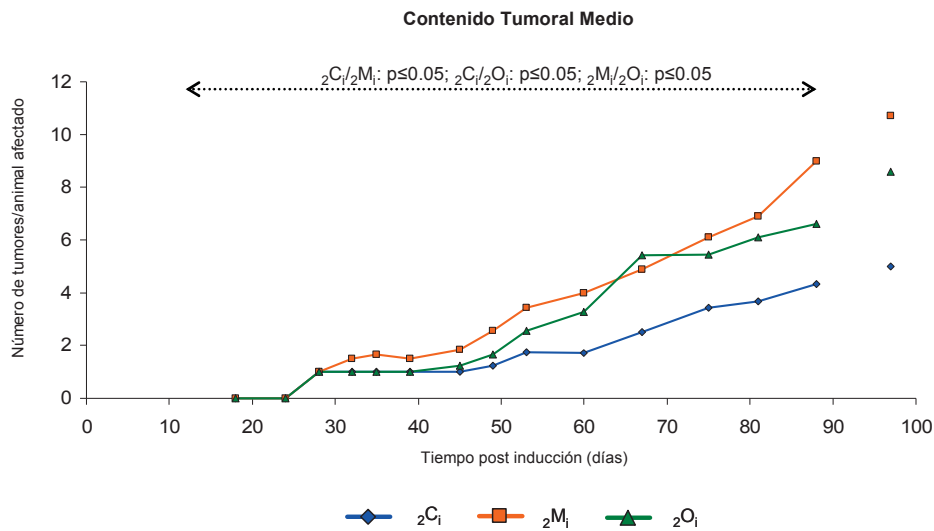


Figura 65. Contenido tumoral medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

2.5. VOLUMEN TUMORAL.

- Volumen tumoral total (V)

El análisis de las curvas del volumen tumoral total mostró que el grupo $2C_i$ presentó valores inferiores a los de los otros dos grupos a lo largo de todo el estudio. Además, en general, el volumen tumoral total fue inferior en el grupo $2O_i$ respecto al $2M_i$, excepto en las últimas palpaciones donde el volumen en el grupo $2O_i$ fue superior al del $2M_i$ (Figura 66). En el sacrificio final los resultados del volumen fueron los siguientes: 48.8 c.c. en $2C_i$, 70.9 c.c. en $2M_i$ y 113.4 para $2O_i$.

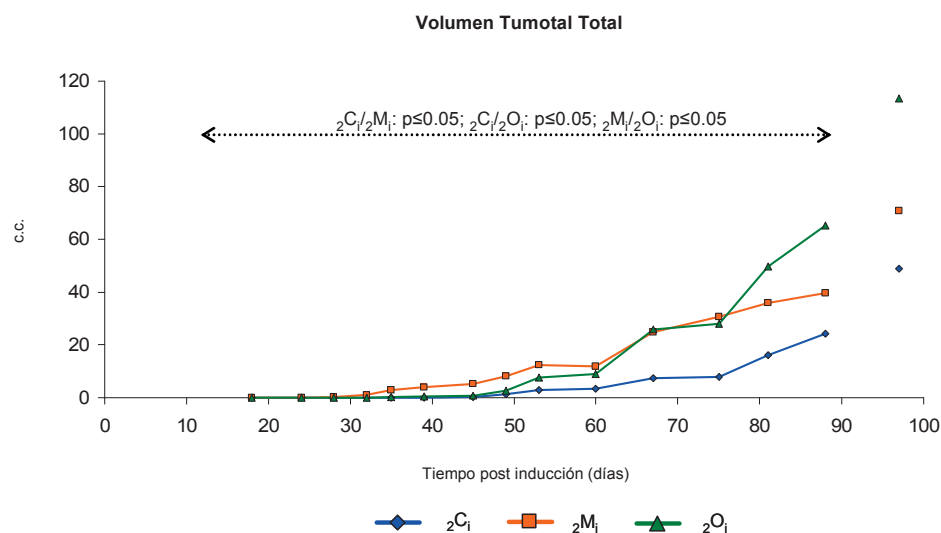


Figura 66. Volumen tumoral total de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

- Volumen tumoral medio por animal (V_A)

Los valores de V_A aumentaron, en general, en todos los grupos experimentales a lo largo del ensayo, siendo el grupo 2C_i el que presentó, de forma estadísticamente significativa, los niveles más bajos en comparación con los otros dos grupos. Por otro lado, los grupos de dieta hiperlipídica presentaron valores variables, superiores para el grupo de aceite de maíz en la primera mitad del estudio del estudio y mayores para el grupo de dieta de aceite de oliva a partir de los 60 días post-inducción, aproximadamente. Las diferencias a lo largo del estudio entre estos dos grupos fueron estadísticamente significativas. En cambio, en el momento del sacrificio final no hubo tales diferencias (Figura 67).

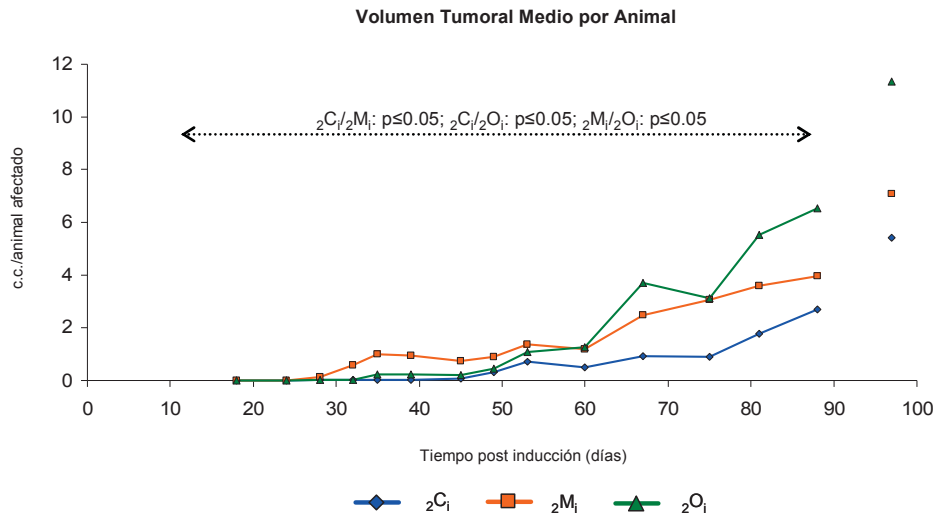


Figura 67. Volumen tumoral medio por animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

- Volumen medio por tumor (V_K)

Del mismo modo que con los otros dos parámetros de volumen, en este caso, en general el grupo $2C_i$ presentó los niveles más bajos. El grupo $2M_i$ presentó los valores más altos hasta aproximadamente el día 55 y a partir de entonces fue el grupo $2O_i$ el que pasó a tener el mayor volumen medio por tumor. En el momento del sacrificio final el grupo $2O_i$ presentó los valores más altos seguido del grupo $2C_i$ y del $2M_i$. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 68).

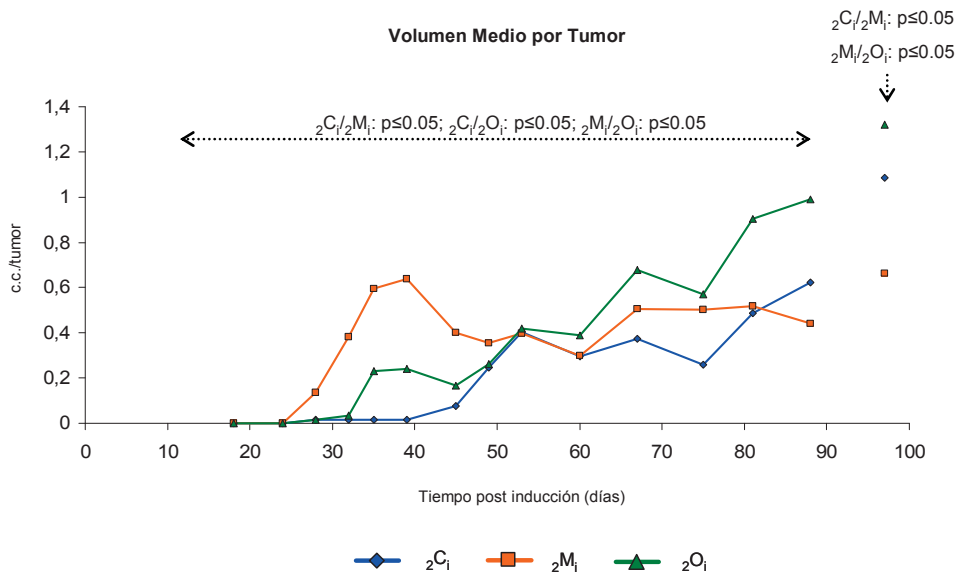


Figura 68. Volumen medio por tumor de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. Serie experimental 2.

E. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL.

El estudio del crecimiento de los animales de los distintos grupos experimentales de las dos series experimentales se basó en el análisis ponderal, a partir de la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo. Los datos se obtuvieron en las 31 y 20 determinaciones semanales que se realizaron en la serie experimental 1 y 2, respectivamente. Además, cabe destacar que a lo largo del ensayo se dedicó especial atención a la exploración de las posibles patologías causadas por desequilibrios nutricionales.

Serie experimental 1:

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

$$Y = \varnothing_1 \{1 - \exp(-e^{\varnothing_2} (t - \varnothing_3))\}$$

dónde \varnothing_1 , \varnothing_2 y \varnothing_3 representan respectivamente la asíntota (Asym), el logaritmo (lrc) de la tasa de crecimiento y la ordenada en el origen (c_0). El método utilizado fue el de los Modelos No lineales Mixtos, considerando que los parámetros Asym y lrc eran diferentes entre los grupos experimentales.

Serie experimental 2:

En este caso los datos no presentaron la complejidad de la serie 1 con lo que no fue necesario realizar un ajuste de una regresión asintótica (no lineal). El análisis de residuos permitió verificar que con una linealización previa (utilizando los logaritmos del tiempo) el ajuste de una regresión polinómica de grado 2 fue suficiente, obteniéndose en todos los casos valores de R^2 superiores a 0.8.

$$\text{Peso} = a + \beta_1 * \log(\text{tiempo}) + \beta_2 * \log(\text{tiempo})^2 + \beta_3 * \log(\text{tiempo})^3$$

El ajuste a una regresión polinómica permitió una mejor interpretación de los resultados ya que fue posible explicar las diferencias entre dietas a partir de los parámetros del modelo: una diferencia en ordenadas querría indicar que en origen los grupos ya eran distintos,

mientras que una diferencia en pendientes (coeficiente de $\log(\text{tiempo})/\beta_2$) indicaría una distinta evolución a lo largo del tiempo

En las Figuras 69 y 70 se muestran la evolución ponderal media y la de los coeficientes de variación del peso corporal de los diferentes grupos de las series experimentales 1 y 2, respectivamente. En ambos casos, los pesos fueron homogéneos a lo largo del estudio, y los coeficientes de variación uniformemente bajos y de evolución constante en todos los grupos experimentales. En la serie experimental 1, el grupo $1M_i$ presentó valores mayores a los otros dos grupos, significativamente superiores al grupo $1C_i$. En la serie experimental 2, el grupo de animales sanos $2M_s$ también presentó valores significativamente superiores que los grupos $2C_s$ y $2O_s$ (Figura 70.A.), y en los animales inducidos los valores del grupo $2M_i$ fueron superiores que los del grupo $2C_i$ (Figura 70.C.).

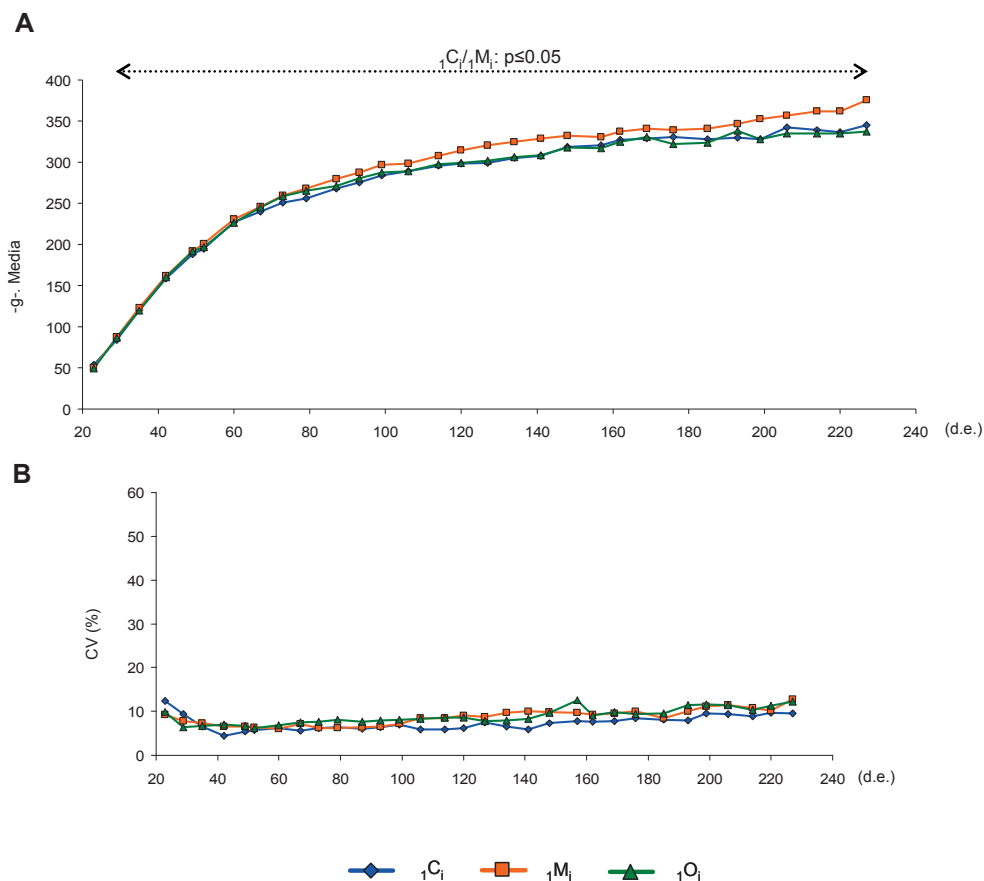


Figura 69. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales de los diferentes grupos de la serie experimental 1. A. Evolución del peso corporal a lo largo del tiempo. B Coeficiente de variación del peso corporal a lo largo del tiempo. d.e.: días de edad; $1C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 1; $1M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; $1O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1.

Utilizando los datos del peso corporal y de la longitud naso-anal obtenidos en el día del sacrificio de cada animal en el caso de la serie experimental 1 (Figura 71), y tanto en la determinaciones semanales como en el día de los sacrificios en la serie experimental 2 (Figuras 72 y 73), se analizó la masa corporal de cada grupo experimental a través del Índice de Lee, específico de rata, y el Índice de Masa Corporal ó Índice de Quetelet. En la serie experimental 1, el Índice de Masa Corporal aumentó de forma significativa a lo largo del tiempo. Por el contrario, el Índice de Lee presentó unos valores similares a lo largo de todo el estudio (Figura 71). Al comparar las diferentes condiciones experimentales, únicamente se encontraron diferencias significativas en ambos parámetros en el sacrificio final (246 d.e.) entre los grupos ${}_1M_i$ y ${}_1C_i$. En la serie experimental 2, dado que tanto el peso como la longitud naso/anal se determinaron semanalmente, el estudio de los índices de masa corporal se realizó a lo largo del tiempo, de forma similar al del peso corporal. Así, para el Índice de Lee se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Friedman, mientras que en el caso del Índice de Masa Corporal se realizó un ajuste a una regresión polinómica:

$$IMC = a + \beta_1 * \log(tiempo) + \beta_2 * \log(tiempo)^2$$

Las diferencias estadísticas en los animales sanos fueron escasas. En el caso del Índice de Masa Corporal, el grupo de aceite de maíz presentó valores significativamente superiores a los del grupo de dieta de aceite de oliva, cuyos valores fueron similares a los del grupo control. En el caso de los animales inducidos, en ambos índices, se observó que el grupo de dieta control presentó, en general, valores inferiores a los de los otros grupos de dieta hiperlipídica (Figuras 72 y 73).

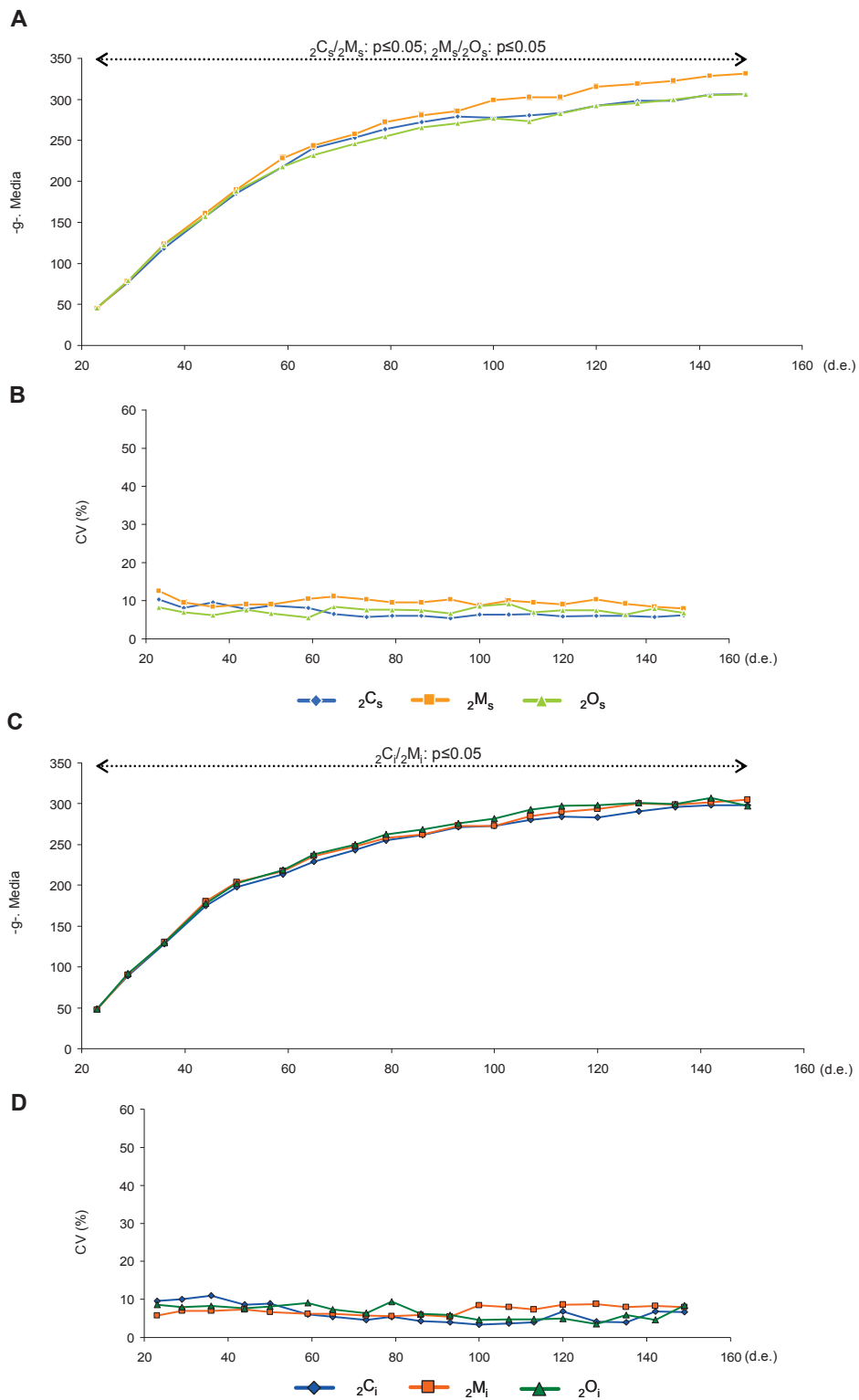


Figura 70. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales de los diferentes grupos de la serie experimental 2. A. Evolución del peso corporal a lo largo del tiempo de los animales sanos. B. Coeficiente de variación del peso corporal a lo largo del tiempo de los animales sanos. C. Evolución del peso corporal a lo largo del tiempo de los animales inducidos. D. Coeficiente de variación del peso corporal a lo largo del tiempo de los animales inducidos. d.e.: días de edad; 2C_s : grupo control sano de la serie experimental 2; 2M_s : grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; 2O_s : grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; 2C_i : grupo control inducido de la serie experimental 2; 2M_i : grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; 2O_i : grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

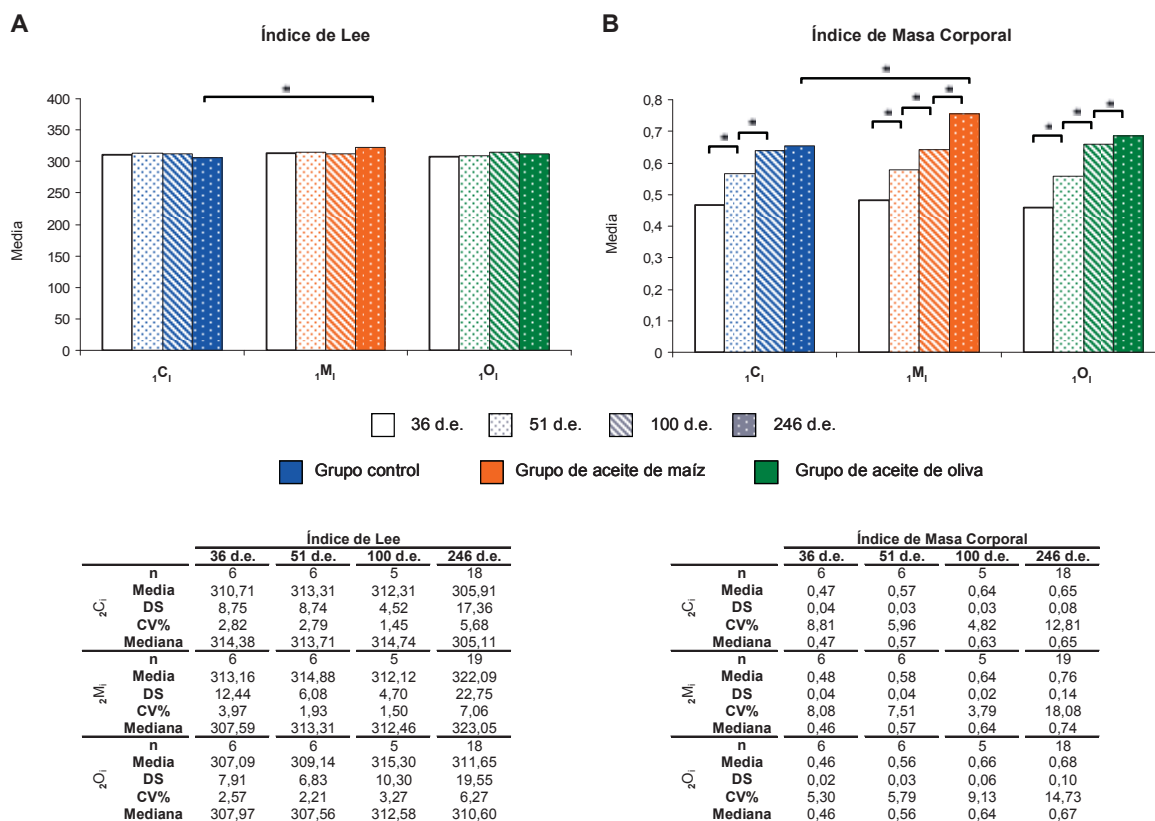


Figura 71. Índices de masa corporal de los diferentes grupos experimentales en la serie experimental 1. A. Índice de Lee $\{[(\text{peso corporal -g})^{1/3} / \text{longitud naso-anal -mm}] \times 10000\}$ para cada uno de los sacrificios. B Índice de Masa Corporal (peso corporal -g- / longitud naso-anal² -cm²-) para cada uno de los sacrificios. d.e.: días de edad; z_{C_1} : grupo control inducido de la serie experimental 1; z_{M_1} : grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 1; z_{O_1} : grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 1.

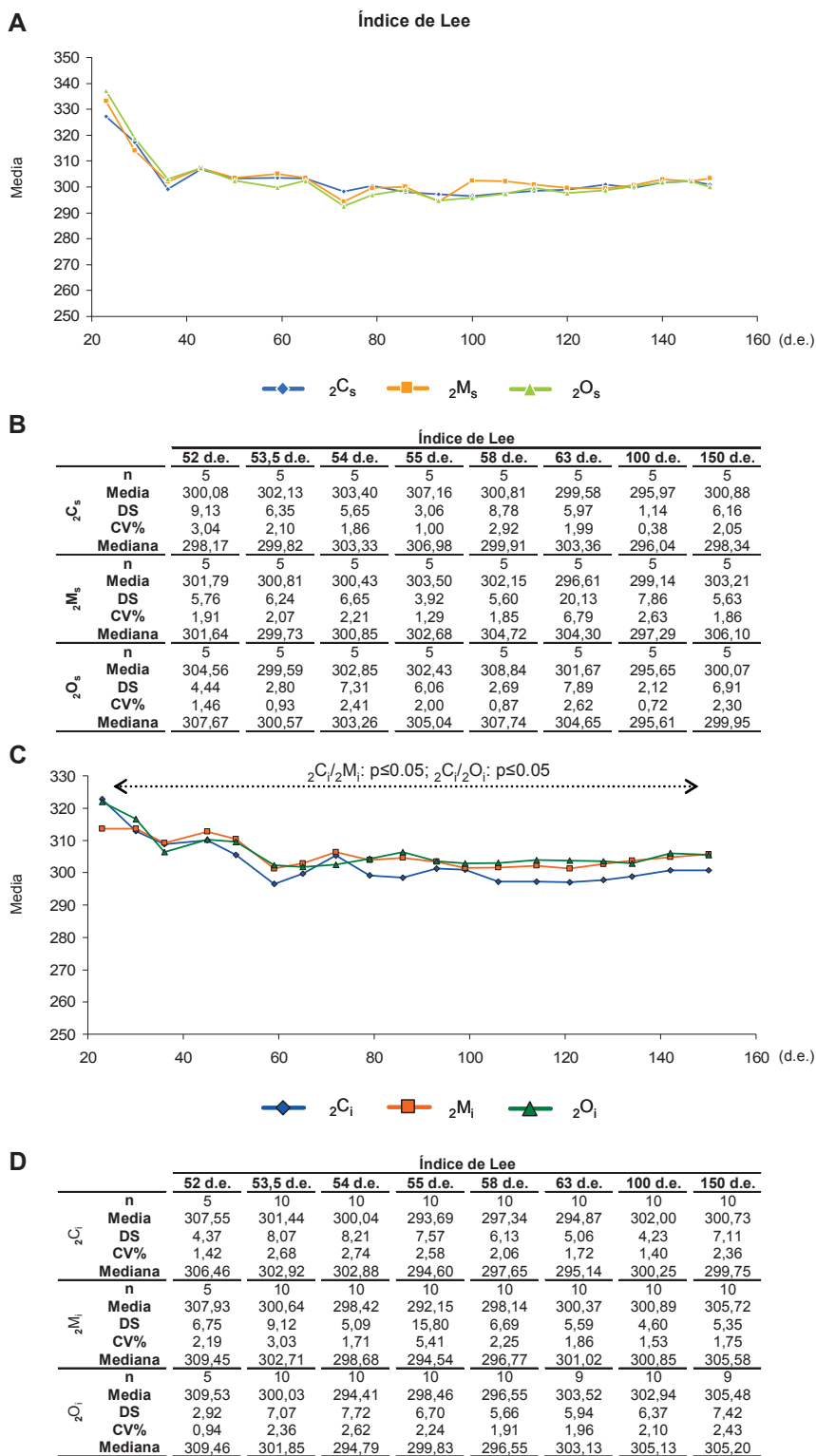


Figura 72. Evolución del Índice de Lee de los diferentes grupos en la serie experimental 2. A. Evolución del índice de Lee $\left\{ \left(\frac{\text{peso corporal -g}}{\text{longitud naso-anal -mm}} \right)^{1/3} \times 10000 \right\}$ a lo largo de todo el estudio en animales sanos. B Índice de Lee en cada una de las edades estudiadas en animales sanos. C. Evolución del Índice de Lee a lo largo de todo el estudio en animales inducidos. D. Índice de Lee en cada una de las edades estudiadas en animales inducidos. d.e.: días de edad; ${}_2C_s$: grupo control sano de la serie experimental 2; ${}_2M_s$: grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; ${}_2O_s$: grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; ${}_2C_i$: grupo control inducido de la serie experimental 2; ${}_2M_i$: grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; ${}_2O_i$: grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.

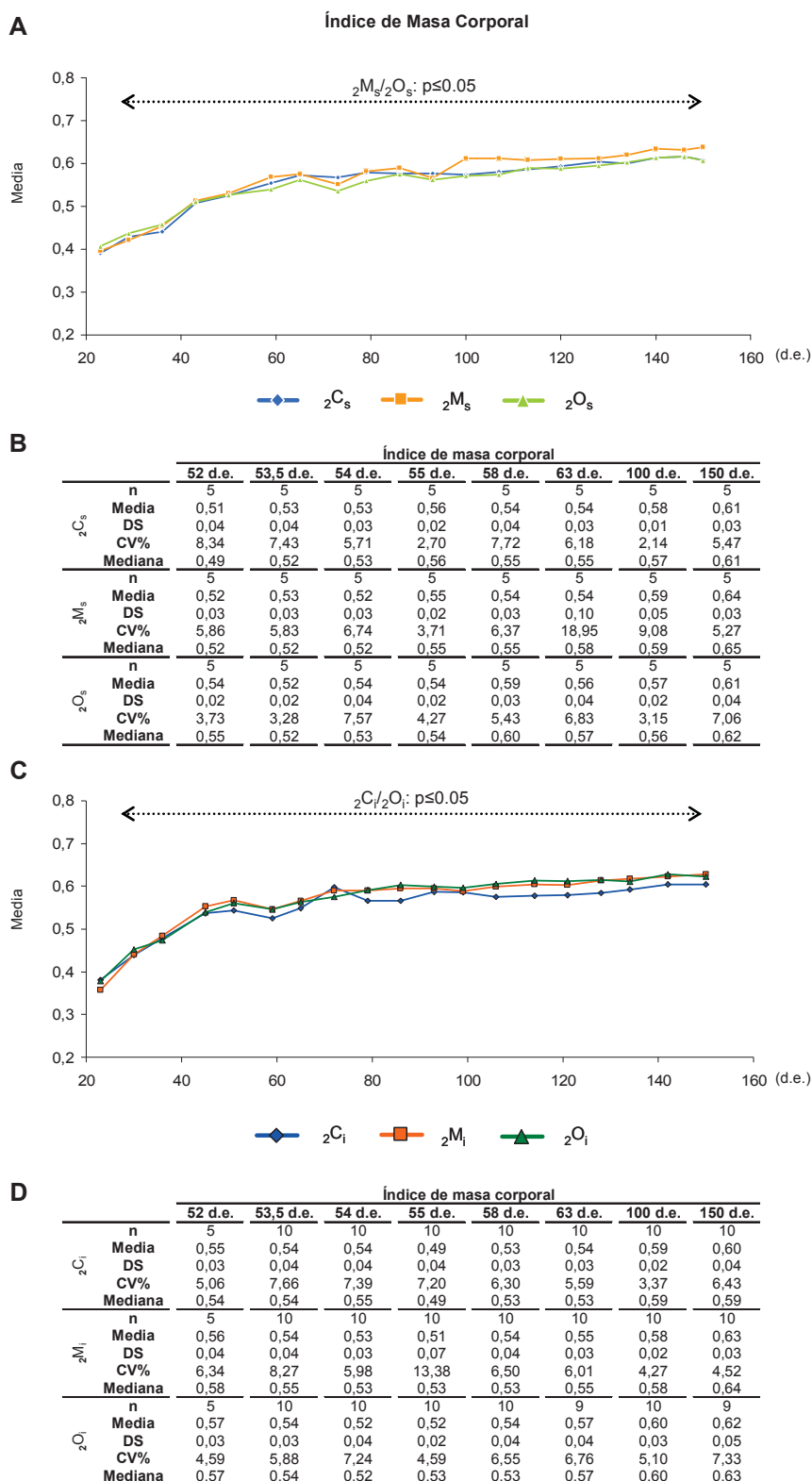


Figura 73. Evolución del Índice de Masa Corporal de los diferentes grupos en la serie experimental 2. A. Evolución del índice de Masa Corporal (peso corporal -g / longitud naso-anal² -cm²) a lo largo de todo el estudio en animales sanos. B Índice de Masa Corporal en cada una de las edades estudiadas en animales sanos. C. Evolución del Índice de Masa Corporal a lo largo de todo el estudio en animales inducidos. D. Índice de Masa Corporal en cada una de las edades estudiadas en animales inducidos. d.e.: días de edad; 2C_s : grupo control sano de la serie experimental 2; 2M_s : grupo de aceite de maíz sano de la serie experimental 2; 2O_s : grupo de aceite de oliva sano de la serie experimental 2; 2C_i : grupo control inducido de la serie experimental 2; 2M_i : grupo de aceite de maíz inducido de la serie experimental 2; 2O_i : grupo de aceite de oliva inducido de la serie experimental 2.



DISCUSIÓN

A. ONTOGENIA DE LAS PRINCIPALES XMEs EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA EN LA RATA SPRAGUE-DAWLEY.

El trabajo realizado en la serie experimental 1 sirvió para caracterizar el patrón de expresión de las XMEs de interés en hígado y glándula mamaria, así como los cambios que se producen en dicho patrón con la edad.

Los resultados mostraron que CYP1A2 es la XME de fase I con mayor expresión en hígado, presentando valores muy por encima de los otros dos CYP1s analizados. En cambio, en la glándula mamaria, CYP1B1 presentó los valores más altos de expresión en relación con los de CYP1A1, mientras que CYP1A2 no se expresó en este tejido. Al comparar la expresión de las enzimas entre los distintos tejidos, se observó que a 24 d.e. la expresión de CYP1A1 en hígado fue superior a la de glándula mamaria, produciéndose posteriormente una disminución paulatina de la expresión de CYP1A1 en ambos tejidos hasta igualarse sus niveles. Por otro lado, la expresión de CYP1B1 fue superior en glándula que en hígado. Este patrón general de expresión de CYP1s está de acuerdo con los resultados obtenidos por diversos autores ([6742], [7384], [8069]). Así, se ha descrito la expresión predominante de CYP1A2 en hígado, donde ésta puede llegar a ser el 10% de los CYPs totales en este tejido, mientras que CYP1A1 y CYP1B1 se expresan principalmente en tejidos extrahepáticos. Por su parte, CYP1B1 presenta una expresión constitutiva con niveles significativos en riñón, corazón, intestinos, pulmón, testículo, timo, útero, ovario, próstata y glándula mamaria. En muchos de estos tejidos dicha expresión está relacionada con la implicación de esta enzima en el metabolismo de hormonas esteroideas ([6742], [7384], [8069]). CYP1A1, en cambio, tiene una expresión constitutiva muy baja en múltiples tejidos, entre ellos hígado, corazón, riñón, intestino, testículo, pulmón, timo, útero, glándula mamaria y ovario. Además, se ha descrito que la inducción de estas enzimas debida a la acción de AhR en los distintos tejidos dependería de los niveles de expresión constitutiva de cada una de ellas. En tejidos donde ya existe una expresión basal importante de alguna de estas enzimas, su inducción sería menor que en aquellos que presentan una expresión baja. Debido a ello, CYP1A1, en general, sería de las tres enzimas la más inducible por efecto de xenobióticos ([6742]).

Respecto a las enzimas de fase II estudiadas, se pudo observar que la expresión hepática de NQO1 fue superior a la de GSTP1, mientras que en glándula mamaria fue GSTP1 la enzima de fase II con mayor expresión. Al comparar los tejidos entre sí, se observó que la

expresión de NQO1 era superior en hígado que en glándula, mientras que la de GSTP1 fue similar en ambos tejidos. Se ha descrito una expresión ubicua en el organismo para ambas enzimas de fase II. Así, NQO1 es una enzima presente de forma constitutiva en la mayoría de tejidos además de ser altamente inducible tras la exposición a un estrés causado por xenobioticos, antioxidantes, oxidantes, metales pesados, luz ultravioleta y radiaciones ionizantes ([7345], [8070]). En general, GSTP1 también se expresa en múltiples tejidos ([8070]). Esta enzima parece ser la de mayor expresión hepática entre todos los miembros de la familia GST en hígado de ratones ([8028]), así como la de mayor ubicuidad y prevalencia en tejidos extrahepáticos ([8035]), entre ellos pulmón y vejiga ([8071], [8072]). Existe escasa información sobre la expresión diferencial en los dos tejidos estudiados, hígado y glándula mamaria, en la rata. En humanos, se han realizado estudios comparativos entre la expresión de múltiples enzimas implicadas en el metabolismo de xenobioticos en varios tejidos, incluyendo el hígado ([8070]), aunque tampoco se han encontrado resultados sobre la expresión en la glándula mamaria.

En relación a los cambios de expresión de las XMEs a lo largo del tiempo, los resultados de este trabajo han mostrado una tendencia al aumento de la expresión de ARNm de CYP1A2 entre los 24 d.e., justo después del destete, y los 36 d.e., alrededor del inicio de la pubertad, seguida de un ligero descenso, especialmente en los grupos $1C_i$ y $1O_i$, obteniéndose unos niveles más o menos estables a lo largo de las siguientes edades estudiadas, ya en la etapa adulta. En cambio, los niveles de proteína mostraron pocos cambios a lo largo del estudio. Todo ello está de acuerdo con lo descrito por otros autores. Así, en la rata Sprague-Dawley se ha constatado que CYP1A2 aumentó su expresión desde los 4 d.e., alcanzando el máximo nivel a los 30 d.e., para, a continuación, disminuir ligeramente hasta unos niveles que se mantienen en la edad adulta del animal, a los 56 y 84 d.e. De la misma manera, la actividad enzimática de CYP1A2 presentó bajos niveles a los 4 d.e. y alcanzó el máximo a los 30 d.e. ([7204]). Simultáneamente se produjeron cambios en el contenido total de CYPs en el hígado, de manera que éste tejido presentaba bajos niveles de CYPs totales a 4 d.e. y fue aumentando hasta alcanzar los niveles más altos a 30 d.e. en hembras y a 56 d.e. en machos, para posteriormente mantenerse estables hasta el final del estudio, a los 84 d.e. ([7204]). Otros autores ([6889]) han descrito que la expresión de ARNm de CYP1A2 en la rata es muy baja en el hígado en estado prenatal así como a 1 y 5 d.e. Posteriormente, ésta incrementa lentamente durante el periodo neonatal (7, 10 d.e.) con un marcado aumento al final de este periodo (14 d.e.), alcanzando la máxima expresión (tres veces superior que en el adulto) al

final de la lactancia (28 d.e.). Durante la pubertad (42 d.e.) fue 2 veces superior que en el adulto (63 y 112 d.e.). En cuanto a la proteína, a 1 d.e. no se detectó, a 3 d.e. los niveles fueron un 25% de los observados en el adulto, y durante los periodos neonatal y de lactancia aumentaron lentamente alcanzando el 45% de los niveles del adulto al inicio de la pubertad (42 d.e.). El aumento de ARNm fue más rápido que el de proteína. La actividad de CYP1A2 se detectó por primera vez a los 3 d.e. con niveles muy bajos, a los 5 d.e. fue un 15% de los niveles del adulto, aumentó rápidamente hasta niveles del orden de 1.5 y 1.7 veces los del adulto a los 21 y 28 d.e., y disminuyó hasta alcanzar los niveles del periodo de adulto a los 42 d.e. (pubertad temprana). Estos datos pusieron de manifiesto la relación más directa entre los niveles de ARNm y los de actividad enzimática que entre el ARNm y la proteína ([6889]). Otros autores también observaron que los niveles de ARNm de CYP1A2 en rata no fueron detectables durante las edades prenatales y postnatales hasta los 7 d.e., cuando empezaron a aumentar, alcanzando los mayores niveles a los 15 d.e. y volviendo a disminuir hasta llegar a la situación del adulto a 42 d.e. ([7909]).

Los niveles de ARNm de CYP1A1 obtenidos en este trabajo fueron mayores a los 24 y 36 d.e. y disminuyeron hasta valores muy bajos a los 51 y 100 d.e. Los niveles de proteína también fueron altos a los 24 d.e. pero disminuyeron rápidamente hasta valores muy bajos en el resto de edades estudiadas. Estos resultados estarían en concordancia con lo observado por diversos autores ([7909]), de manera que a los 21 d.e. se detectó proteína de CYP1A1 mientras que a 84, 182 y 728 d.e. ésta no se encontró. Ese mismo patrón se halló en la actividad EROD. Otros autores también han descrito que los niveles de ARNm de CYP1A1 son muy superiores entre el día 1 prenatal y los 26 d.e. en comparación con los niveles del adulto a 42 d.e. ([7909]).

En relación a la expresión de CYP1B1, los resultados mostraron una clara tendencia a la disminución progresiva desde los 24 hasta los 100 d.e., tanto de ARNm como de proteína. No se han encontrado estudios similares en la literatura internacional. Sin embargo, en hígado de ratón, un estudio de la evolución de la expresión desde dos días prenatales hasta 45 d.e. mostró que la expresión de CYP1B1 aumentó inmediatamente después del parto y posteriormente fue constante a lo largo del tiempo, siendo muy inferior a la de CYP1A1 y CYP1A2 ([8063]). En este caso, no se observó el aumento de expresión de ARNm a 24 d.e., en comparación con las edades posteriores, que se ha hallado en este trabajo.

De forma general, durante la ontogenia de los CYP1s en el desarrollo del hígado se considera que la expresión de CYP1A1 es principalmente prenatal y la de CYP1A2 mayoritariamente postnatal, encontrándose ya expresado cerca del nacimiento ([6998]). Los niveles de proteína parecen ser bajos en animales no tratados con agonistas de AhR en la mayoría de edades para ambas enzimas, a pesar de que se pueden detectar bajos niveles de CYP1A1 en ratas de 5 d.e. mientras que CYP1A2 puede detectarse en ratas adultas, pero no en las 24 horas pre y postnatales. Estos fenómenos podrían estar relacionados con su posible papel en el mantenimiento de los niveles basales de ligandos endógenos que podrían modular la división celular, el crecimiento y algunas funciones neuroendocrinas ([6998], [8073]).

El patrón de expresión tisular de los distintos CYP1s en la rata también está relacionado con los distintos periodos a lo largo del desarrollo. En cuanto a la localización hepática de los CYP1s, en el hígado adulto la proteína se detecta a partir de los 15 días de edad en las células centrales de los lóbulos hepáticos. Durante el desarrollo embrionario, CYP1A1 se expresa en la mayoría de los hepatocitos en las 72 horas previas al parto. En las 24 horas previas los niveles de proteína son prácticamente indetectables, y a los 5 d.e. ésta se encuentra rodeando la vena central de los lóbulos. Sin embargo, en animales tratados con el PAH 3-metilcolantreno (MC) CYP1A1 está fuertemente y homogéneamente expresado en el citoplasma de la mayoría de hepatocitos ([6998]). La detección por inmunohistoquímica de CYP1A2 se produce de forma débil en la mayoría de hepatocitos en animales a 72 horas preparto y no cambia durante el parto ni a los 5 días postparto. Sin embargo, a los 15 días de edad su distribución se produce mayoritariamente en los hepatocitos centrolobulares y se detecta débil o moderadamente en otras regiones. El tratamiento con PAHs no produjo grandes cambios en las situaciones preparto, mientras que el tratamiento a los 5 y 15 d.e. supuso un drástico incremento de los niveles de esta enzima en la mayoría de hepatocitos ([6889], [6998]).

Con el fin de investigar si los cambios en la expresión de los CYP1s producidos con la edad estaban mediados por AhR, se analizó la retención citoplasmática de dicho factor de transcripción. El aumento de dicha retención citoplasmática observada a 100 d.e. podría asociarse con la baja expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 a esa misma edad. Sin embargo, el aumento de los niveles de proteína AhR a lo largo del tiempo, y las escasas variaciones de los niveles de ARNm ponen de manifiesto la complejidad de la regulación de la expresión basal y constitutiva de los CYP1s durante el desarrollo del hígado por parte de

AhR. Éste es un tema complejo, todavía no bien dilucidado. Múltiples trabajos han implicado a AhR no sólo en una función activadora de CYPs y de otras XMEs, para la defensa del organismo frente a la exposición de xenobióticos, sino también en múltiples funciones durante el desarrollo y la morfogénesis en mamíferos, a través de diferentes vías. Además, diversos estudios sobre la distribución de AhR en los tejidos durante el desarrollo y en animales adultos han demostrado que AhR se expresa de forma tejido-específica durante el desarrollo ([7852], [8074], [8075]). Otros trabajos también han mostrado que la expresión de CYP1A2 también podría estar relacionada con el factor de transcripción AP-1 y, por lo tanto, su expresión constitutiva en hígado no dependería únicamente del efecto de AhR ([8076]). Por otra parte, la capacidad de AhR para activar la transcripción génica no sólo depende de su retención en citoplasma por la proteína Hsp90. Diversos cofactores nucleares como ARNT, AHRR, AINT y ADPF, múltiples coactivadores y correpresores de la transcripción génica como p23, SRC-1, NCoA-2, p300, RIP 140, SMRT y SHP, y la interacción con otros factores de transcripción como NF-1, ER α , Rb y NF-kB entre otros, modulan la capacidad transactivadora de AhR, así como su función en la célula durante el desarrollo ([7182], [7391], [7418], [7850], [8077], [8078], [8079]).

La expresión de las enzimas de fase II analizadas en este trabajo presentó menores variaciones a lo largo del tiempo que la de las enzimas de fase I. Así, se observó una tendencia a la disminución de la expresión de ARNm de GSTP1, especialmente en los grupos $1C_i$ y $1O_i$, mientras que la expresión de NQO1 presentó pocas modificaciones significativas, salvo por un descenso entre los 36 y 51 d.e. en el grupo $1M_i$, que también se pudo observar, aunque en menor grado, en el grupo $1O_i$. Los niveles de proteína GSTP1 mostraron una gran variabilidad con la edad, mientras que los de NQO1 presentaron un gran aumento a 100 d.e. Existe escasa información sobre la ontogenia de las XMEs de fase II. En general, se ha descrito que la expresión de GST total en hígado de rata presenta bajos niveles durante la gestación y aumenta lentamente desde el parto hasta los 28 d.e., cuando alcanza los niveles propios del adulto ([8059]). No se han hallado trabajos sobre los niveles de proteína GSTP1 ni sobre los de expresión de ARNm y proteína de NQO1.

Con el mismo objetivo que al estudiar AhR, se analizó el efecto de Nrf2 sobre la regulación de las enzimas de fase II. Los resultados no revelaron una relación directa entre la expresión de las XMEs de fase II estudiadas y los valores de retención citoplasmática de Nrf2 con los cambios relacionados con la edad. Sin embargo, sí se obtuvo una cierta correlación

entre el descenso general a lo largo del tiempo de los niveles de proteína de GSTP1, principalmente, con el descenso de proteína observado con la edad para Nrf2. Por otra parte, estos niveles de proteína fueron contrarios a los niveles de expresión de ARNm que tendieron a aumentar con la edad. La regulación de este factor de transcripción es, hasta la fecha, poco conocida y compleja. Diversos trabajos han obtenido resultados contradictorios. Mientras que algunos autores han descrito que los inductores de Nrf2 no generan un incremento del ARNm de este factor de transcripción *in vitro* ([8080], [8081]), otros han descrito una inducción de su expresión por efecto de diversos activadores de Nrf2 ([8082], [8083]). Además, se ha descrito una regulación de la traducción del ARNm hacia proteína debida a la existencia de regiones de reconocimiento con el ribosoma sensibles del estado redox (IRES) en el ARNm de Nrf2, responsable de la regulación de la traducción frente al estado redox celular ([8085]). Así, tal como se mencionó en la Introducción de este trabajo, la posible activación de Nrf2 de forma independiente del estado redox de la célula y sin mediar la acción de Keap1 ([8086]), la relación con otras vías de señalización mediadas por p62, NF-kB, p21/p53 y Notch1 ([7414]), y su posible relación con el metabolismo de la glucosa, el de lípidos, el metabolismo del hierro y los grupos hemo, y de la actividad mitocondrial ([8084]), hacen que su estudio e interpretación sean complejos y aún poco conocidos.

La ontogenia de las XMEs en glándula mamaria ha sido poco estudiada. Con la información disponible, los resultados obtenidos en este trabajo serían los primeros en describir un gran aumento en la expresión de ARNm de CYP1A1 a 36 d.e. seguido de un rápido descenso hasta los bajos niveles iniciales en las edades adultas. La expresión de ARNm de CYP1B1 también sufre un incremento a los 36 d.e., alcanzando sus niveles más altos a los 51 d.e., para volver a descender a los 100 d.e. Este patrón de expresión de los CYP1s en la glándula mamaria podría estar relacionado con el periodo de inicio de la pubertad de la rata y el desarrollo de la glándula, teniendo en cuenta la importancia de los CYP1s en el metabolismo de estrógenos, principalmente en el caso de CYP1B1 ([7384], [8087]). En cuanto a las enzimas de fase II, la expresión tanto de ARNm como de proteínas GSTP1 y NQO1 presentó muy pocas variaciones con la edad, a excepción del aumento de los niveles de proteína de NQO1 a 100 d.e. Ello podría estar de acuerdo con su expresión ubicua en múltiples tejidos, sin presentar aparente importancia durante el desarrollo de la glándula mamaria ([7345], [8035], [8070]).

Una vez analizada la expresión de las XMEs de fase I y fase II, con el objetivo de obtener una visión más global de los cambios producidos en su expresión a lo largo del tiempo en los distintos grupos experimentales, se calculó una ratio entre los niveles de ARNm de fase I/fase II. En hígado, mientras los grupos ${}_1C_i$ y ${}_1O_i$ presentaron unos valores estables a lo largo del tiempo, en el grupo ${}_1M_i$ la ratio fase I/fase II aumentó con la edad. En glándula mamaria todos los grupos presentaron un aumento a los 36 y 51 d.e., con respecto a 24 d.e., y una disminución a los 100 d.e. El grupo ${}_1M_i$ fue el que presentó los niveles más altos de la ratio a los 36 d.e., superiores a los observados en los otros grupos en todas las edades estudiadas. Un aumento de la ratio fase I/fase II podría asociarse con un aumento de la expresión de las enzimas de fase I y/o una disminución de la expresión de las enzimas de fase II. En ambos casos, ello podría suponer un aumento en la formación de compuestos activos a partir de xenobióticos por parte de los CYP1s y/o una disminución de su inactivación por parte de las XMEs de fase II. Esta situación favorecería una mayor formación de compuestos reactivos que podrían generar daño genómico, tanto en hígado como en glándula mamaria. Los valores más altos de la ratio a 51 d.e. en hígado y a 36 d.e. en glándula mamaria debidos a la dieta rica en aceite de maíz estarían de acuerdo con la mayor carcinogenesis observada en este grupo. En cambio, los valores obtenidos en los animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva serían similares a los de los animales control, sugiriendo una formación de compuestos reactivos parecida en estos dos grupos experimentales. Ello concordaría con un rendimiento de la carcinogénesis más similar entre ambos, e inferior al del grupo ${}_1M_i$.

Se ha descrito que los efectos tóxicos de carcinógenos activados metabólicamente por CYPs son particularmente altos en células proliferativas ([8088], [8089]). Por tanto, resulta de gran importancia el estado de desarrollo y maduración de cada tejido en relación a su susceptibilidad frente a la exposición a xenobióticos. Así, se ha demostrado que ratas de 28 d.e. son más sensibles a la genotoxicidad de carcinógenos que requieren la activación de CYPs que las de 42 d.e. ([8090], [8091]). Del mismo modo, el estado de desarrollo de la glándula mamaria sería esencial para determinar su susceptibilidad a la transformación neoplásica. Se ha descrito que los TEBs son el compartimento de la glándula mamaria más sensible al efecto de compuestos carcinogénicos ([2952], [3122]). Estas estructuras son las que presentan mayor proliferación celular, aproximadamente el 50% de sus células son proliferativas ([1520], [2952], [3122], [8092], [8093]). Durante el desarrollo de la glándula mamaria, tras los periodos neonatal e infantil del animal, a partir de las dos semanas de edad se comienzan a desarrollar los TEBs desde los ductos, alcanzando su mayor número a los 21-

28 d.e. Con el inicio del ciclo estral de la rata, alrededor de los 35-42 d.e., se inicia un patrón cíclico de mitosis en los TEBs, migración celular y remodelación de la matriz extracelular, para contribuir a la elongación y ramificación de los ductos, produciendo una invasión progresiva del tejido adiposo circundante para formar los ductos terminales (TDs) y los “alveolar buds” (ABs), estructuras previas a la formación de lobulillos. Además, en ratas Sprague-Dawley no gestantes se produce un desarrollo lóbulo-alveolar entre los 50-55 d.e., similar a la situación observada a los 7 días de gestación, periodo en el cual se produce una rápida actividad mitótica y división celular. Tras los 55 d.e. el número de lóbulos queda prácticamente estable, a pesar de que cambios histológicos de tamaño y del desarrollo secretor continúan ocurriendo durante el ciclo estral ([8087]).

En el modelo animal de cáncer de mama utilizado en este trabajo, se ha descrito que la mayor susceptibilidad de los animales al efecto del DMBA se produce alrededor de los 50-55 d.e. ([2952], [3122]). Estas edades coincidirían con el periodo anteriormente descrito de alta proliferación de los TEBs que se produce de forma fisiológica. Sin embargo, existe un alto grado de proliferación celular desde el inicio de la pubertad, entre los 35-42 d.e., hasta los 55 d.e., momento en el que el número de TEBs se estabilizaría. Además, en los posteriores ciclos estrales, ya durante la edad adulta, continúa un proceso cíclico de crecimiento y diferenciación celular que confiere un amplio margen de acción para los metabolitos activos procedentes de la exposición a xenobióticos. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la dieta rica en aceite de maíz se asocia con mayores valores de la ratio fase I/fase II en hígado a lo largo del tiempo. Asimismo, en glándula mamaria esta dieta genera valores de la ratio mayores y de forma más temprana que en los otros dos grupos experimentales. Esto podría suponer un adelanto y quizás también una ampliación de la ventana de susceptibilidad a xenobióticos en los animales alimentados con dietas ricas en PUFA n-6. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, a pesar de su alto contenido en lípidos, generaría una situación similar a la de la dieta control.

B. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS XMEs POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA.

Los resultados del análisis del ARNm de las XMEs de fase I en hígado, en general, mostraron que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz aumenta los niveles de ARNm con respecto al grupo control. Este efecto se observó para CYP1A1 y CYP1A2 en todas las edades estudiadas y para CYP1B1 a 100 d.e. Mientras que la dieta de aceite de oliva y la dieta control presentaron niveles de expresión próximos para todas las enzimas la mayoría de edades estudiadas. En cambio, los niveles de proteína de estas enzimas no presentaron diferencias claras entre los distintos grupos y edades y, además, en general, sus perfiles no coincidieron con los del ARNm. Esta situación discordante entre niveles de ARNm y de proteína ya se comentó anteriormente y será discutida en profundidad en éste apartado y en el siguiente.

En cuanto a las XMEs de fase II, los niveles de ARNm de las enzimas estudiadas en hígado mostraron escasas diferencias entre grupos y edades. De forma general, se observó una tendencia en el grupo de dieta rica en aceite de oliva virgen extra a presentar mayores niveles de ARNm de NQO1 y GSTP1 que en el grupo de aceite de maíz. En algunas edades, sin embargo, como a 51 d.e., únicamente NQO1 presentó niveles superiores debido a la dieta de aceite de oliva respecto a la de aceite de maíz. Los niveles de proteína de las enzimas de fase II también presentaron escasas diferencias entre grupos, a excepción de los 36 d.e., cuando el grupo de dieta rica en aceite de maíz presentó niveles superiores de ambas enzimas en comparación con los otros dos grupos experimentales. Este aumento de proteínas de fase II a esta edad podría estar relacionado con un mecanismo de defensa antioxidante del organismo ante el estrés oxidativo causado por el consumo, desde los 24 d.e., de una dieta con alto contenido en PUFA n-6, altamente susceptibles a sufrir oxidación y generar radicales libres ([6422]). Dicha respuesta antioxidante desaparecería con el tiempo, de manera que en las edades posteriores estudiadas la situación de los diferentes grupos se iguala. Por otra parte, al igual que ocurrió con las enzimas de fase I, tampoco se encontró una relación directa entre los niveles de ARNm y los de proteína.

Diversos trabajos han demostrado la influencia de ciertos componentes de la dieta en la expresión y actividad de las XMEs, habiéndose descrito que éstos pueden actuar únicamente sobre el metabolismo de determinadas enzimas de la fase I, o de la fase II, o de

ambas fases ([6540]). Los estudios sobre el efecto de macronutrientes son escasos. En el caso de los lípidos de la dieta, con la información disponible, no se han encontrado trabajos sobre los efectos de estos nutrientes y los CYP1s. Algunos autores han demostrado el efecto de algunos aceites utilizados como vehículo de fármacos en los niveles constitutivos e inducibles de otros CYPs implicados en el metabolismo de diversos xenobióticos o fármacos. Así, la administración en ratas durante 7 días de aceite de maíz y de oliva, en cantidades similares a las utilizadas como vehículo, provocó una disminución de los niveles hepáticos de la proteína CYP2C11, postulándose que dicho efecto podría ejercerse modificando la composición en ácidos grasos de la membrana de los microsomas hepáticos ([6888]). En este sentido, otros autores demostraron que en ratas a las que se les administró un 20% de aceite de maíz se produjo un aumento de fosfolípidos (20:4) y una disminución de fosfolípidos (16:0, 16:1, 18:1), mientras que la administración del 20% de aceite de oliva causó un aumento de fosfolípidos (18:0 y 20:4) y una disminución del mismo tipo de fosfolípidos que en el caso del aceite de maíz ([8098], [8100]). Los mecanismos por los cuales los cambios en la composición de los fosfolípidos de los microsomas hepáticos podrían influir la actividad metabólica no son bien conocidos pero se ha propuesto que éstos podrían modificar la tasa de transferencia de electrones entre el NADPH, las reductasas y los CYPS al alterar el equilibrio *spin* de los CYPs, o bien la fluidez de la membrana ([8156], [8157]).

En relación al efecto de otros macronutrientes, se ha descrito que el déficit proteico en ratas (5% de caseína durante 4 semanas) disminuyó la actividad hepática de CYP1A2, CYP2C11 y CYP3A1/2 ([8094]). La actividad de CYP1A1 y CYP3A2 en hígado también se vio disminuida en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa (60% del total de calorías) en comparación con una dieta control sin sacarosa ([8095]). Otros autores han postulado que altos niveles de glucagón estimulan la actividad de los CYPs y de GST en hígado de rata ([8057]). Por otra parte, ratas alimentadas con proteínas de la soja presentaron una menor actividad EROD en hígado que las alimentadas con caseína, mientras que la expresión de ARNm de CYP1A1 fue menor en ratas alimentadas con hidrolizados de proteína sérica de leche bovina que en ratas alimentadas con proteínas de soja o caseína. Sin embargo, los niveles de proteína de CYP1A1 no presentaron cambios. Tras la administración de DMBA el aumento de la expresión hepática de ARNm fue menor en los grupos alimentados con proteínas de soja o de suero de leche bovina que en las ratas alimentadas con caseína. A nivel de proteína, no se observaron cambios en CYP1A2, y CYP1A1 sólo disminuyó en el grupo de la soja. La reducción hepática de ARNm de CYP1A1 y CYP1A2 no se tradujo en cambios

paralelos de la expresión de proteína ([6969]). Otros autores también han descrito una discordancia entre niveles de ARNm de CYP1s y sus correspondientes niveles de proteína ([6889], [8051]), en línea con lo observado en el presente trabajo.

El efecto de micronutrientes y/o compuestos fitoquímicos de los alimentos sobre la regulación de las XMEs ha sido ampliamente estudiado ([6540]). Así, la administración de té verde y té negro en ratas por vía intragástrica durante 6 semanas estimuló la actividad hepática de CYP1A2 y, en menor medida, de CYP1A1 y CYP2B1. Esta administración también aumentó la actividad UGT, pero no modificó la actividad GST ([8101]). Asimismo, la administración oral de cafeína incrementó la actividad de CYP1A2 en microsomas hepáticos ([8102]), sugiriendo que dicho compuesto induciría su propio metabolismo ([8103]). Por otra parte, trabajos recientes de Szaefer H *et al.* ([8054]) han descrito que la administración en ratas de zumo de remolacha, alimento muy consumido en países del este y del centro de Europa, y rico en pigmentos naturales, antioxidantes, fibra soluble y diversos minerales y vitaminas, no afectaría ni los niveles hepáticos de proteína ni los de actividad de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. En cambio, sí podría ejercer un efecto sobre la actividad de GST, aumentándola en situaciones previas a la administración del carcinógeno, mientras que este aumento no se produciría a las 24 horas tras la administración del DMBA. Los niveles de actividad y proteína de NQO1 en hígado también aumentaron antes de la administración del DMBA, mientras que no variaron a las 24 horas de ésta ([8054]). Utilizando el mismo modelo experimental, estos autores observaron que la administración de zumo de manzana, rico en polifenoles y otros fitoquímicos como flavonoles y catequinas, disminuyó la actividad hepática de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 de forma constitutiva. Sin embargo, tras el tratamiento con DMBA, en todos los grupos experimentales el aumento observado fue similar, independientemente de la administración de zumo de manzana. Por otro lado, este zumo aumentó la actividad en hígado de NQO1 y GST previa al tratamiento con DMBA y también, aunque en menor medida, tras su administración en el caso de NQO1 ([8055]). Otros trabajos realizados con extractos vegetales como el de *Azadirachta indica*, árbol de nim o lila india, han mostrado una capacidad moduladora de la actividad de las enzimas de fase I y fase II en hígado y glándula mamaria de rata. Así, estos extractos disminuyeron la actividad EROD mientras que aumentaron la actividad GST y NQO1 en ambos tejidos, posiblemente debido a la combinación de diferentes compuestos fitoquímicos presentes en los extractos de esta planta ([6712]).

También existen numerosos estudios sobre el efecto individual de diversos compuestos procedentes de las plantas ([6850], [7906]). Entre ellos, isoflavonas como diadzein disminuyeron los niveles de CYP1A1 y CYP1B1, así como la actividad EROD, en microsomas hepáticos de ratón tratados semanalmente con DMBA a bajas concentraciones ([6649]). El eugenol, un alilbenceno, también ha demostrado capacidad para disminuir la expresión hepática de CYP1A1 y aumentar la de la familia UGT en un modelo experimental de rata ([8053]). Resultados variados y, en algunos casos, contradictorios se han encontrado en relación al efecto de flavonoides procedentes de la dieta sobre la expresión de ARNm, de proteína y actividad de los CYP1s. Así, se han descrito tanto efectos inhibidores de la transcripción y actividad como efectos activadores. Tales acciones serían tejido específicas y dependientes de la administración y la dosis del compuesto ([8050]). Diferentes coumarinas han demostrado un efecto estimulador de la actividad de GST y NQO1 en hígado de ratones, de forma dependiente o independiente de Nrf2, en función de las sustituciones dentro del anillo aromático central. En este sentido, imperatorina y auraptena indujeron la actividad de estas enzimas de fase II a través de Nrf2 y las regiones ARE, mientras isopimpinellina actuaría mediante un mecanismo independiente de Nrf2, posiblemente a través de CAR y PXR ([6542]). Algunos de estos compuestos se hallan presentes en el aceite de oliva virgen extra. Cabe destacar, sin embargo, que todos estos trabajos se han realizado *in vitro*, no habiéndose encontrado estudios que analicen los efectos del alimento completo, es decir, del aceite de oliva.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de las XMEs de fase I, se investigó el posible papel de AhR en los cambios observados. Los resultados mostraron una menor retención citoplasmática de este factor de transcripción en el grupo de dieta de aceite de maíz a 51 d.e. Además, este mayor grado de activación de AhR estuvo acompañado de un aumento de los niveles de proteína total. Ambas situaciones estarían de acuerdo con la mayor expresión de CYP1s detectada en este grupo. Por su parte, el grupo $1O_i$, alimentado con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, en general, tendió a presentar una mayor retención en citoplasma y menores niveles de proteína AhR en comparación con el grupo $1M_i$, en concordancia con la menor expresión de CYP1s en el grupo $1O_i$. Sin embargo, y paradójicamente, los niveles de ARNm de AhR fueron mayores en este grupo, $1O_i$, en comparación con los otros dos grupos en todas las edades estudiadas.

Tal como ya se expuso en el apartado anterior, la regulación de la expresión de CYP1s por AhR es de una gran complejidad. Además, diversos componentes dietéticos son capaces de modular la función de este factor de transcripción. Existen una gran cantidad de ligandos naturales de AhR capaces de generar, en mayor o menor medida, una respuesta no tóxica de regulación de la transcripción génica. La mayoría de ligandos naturales de AhR son introducidos en los sistemas biológicos por consumo oral de alimentos y hierbas medicinales. Éste es el caso de algunos flavonoides, como quercetina y tengeritina, estilbenos, como el resveratrol, carotenoides, como la curcumina, e indoles y otros compuestos ([7853]). En este sentido, a priori, resulta sorprendente que en este trabajo el grupo de la dieta de aceite de maíz, rica en PUFA n-6 y carente de componentes minoritarios (ver Tablas 2, 3 y 4 de Materiales y Métodos), fuera el que presentó una mayor expresión de las enzimas de fase I, asociada con una mayor activación y niveles mayores de proteína AhR, en comparación con el grupo de dieta de aceite de oliva virgen extra, caracterizado por su riqueza en compuestos bioactivos minoritarios, además de su alto contenido en MUFA n-9. Este grupo, en general, presentó perfiles de expresión de CYP1s y regulación por AhR similares a los del grupo control. Todo ello sugiere un efecto diferencial del componente lipídico de los aceites de maíz y de oliva sobre la regulación por AhR.

Existen numerosas evidencias de la implicación de AhR en el metabolismo lipídico de manera que diferentes ligandos de AhR, tanto endógenos como exógenos, parecen poder modificarlo. Algunos trabajos han descrito que la activación continuada de AhR por parte del inductor TCDD, asociada además a una dieta rica en grasas, podría promover esteatosis hepática mediante un incremento de la absorción intestinal, el aumento de ácidos grasos libres y triacilglicéridos en suero, así como la absorción y acumulación hepática mediante la activación de la biosíntesis de triacilglicéridos y la inhibición de la secreción de VLDL. Múltiples genes podrían estar implicados en este proceso, además de otros factores de transcripción como PPARs, Foxo1 y HFN4 α ([8056]). Otros ligandos, además del TCDD, incluyendo metabolitos endógenos (indoles, tetrapirroles y metabolitos del ácido araquidónico), compuestos de origen natural (como metabolitos indoles y flavonoides de origen vegetal) y compuestos xenobióticos podrían modular el metabolismo lipídico a través de la acción de AhR ([7173], [8023]). Existen indicios de que los PUFA n-6, presentes en gran cantidad en la dieta de aceite de maíz, podrían también regular AhR. El ácido araquidónico (AA) y otros PUFA son metabolizados a partir de 3 vías, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y la epoxidación por citocromos P450. Esta última es la menos conocida y se

han descrito múltiples familias de CYPs implicados en ella, entre ellos CYP1A y CYP1B1. Así, Nebert DW y Karp CL ([8105]) han propuesto que muchos de los efectos biológicos de AhR estarían mediados por la síntesis de eicosanoides. El ácido linoleico, el principal ácido graso del aceite de maíz, es un precursor del AA, implicado en el metabolismo de prostaglandinas, principalmente de PGG₂, el cual es un importante activador endógeno de AhR ([8049]). Entre los genes regulados por AhR relacionados con el metabolismo del AA se hallan prostaglandina endoperoxidasa H₂-sintasa-2 (PGHS-2) ([8106]) y CYP1A1 y CYP1B1 ([8107], [8108]). Por tanto, los propios metabolitos del AA serían responsables de activar su metabolización ([8049]). Otros trabajos han demostrado el efecto activador de AhR por las LDL modificadas por oxidación o acetilación. El mecanismo por el cual dichas LDL modificadas, que pueden ser reactivas y perjudiciales en relación con enfermedades cardiovasculares, activan AhR aún es desconocido. Se ha especulado con un posible activador de AhR transportado por estas LDL modificadas, así como con un mecanismo de respuesta indirecto de la célula que genere AMPc o AA que podrían resultar en agonistas de AhR. Esta respuesta de AhR podría constituir un mecanismo de defensa de la célula para la eliminación de estas LDL modificadas debido a que AhR regula la expresión de enzimas como Paraoxonase-1, una enzima asociada a las HDL que previene la oxidación de LDL. También está probablemente asociada con NQO1 y su posible función en el mantenimiento de los antioxidantes liposolubles endógenos como α -tocoferol-hidroquinona y ubiquinol en su forma reducida y activa ([7389]). Además, la activación de AhR en macrófagos promueve la fagocitosis de LDL modificadas y su transformación a células espumosas ([8109]). Otros ligandos endógenos podrían actuar como inhibidores de la actividad AhR. Es el caso del 7-ketocolesterol, un derivado oxidado del colesterol, que ha sido descrito por bloquear la acción activadora de AhR por parte del TCDD ([8110]). Por otra parte, se ha demostrado que los niveles de proteína de AhR disminuyen con la diferenciación del tejido adiposo, siendo elevados en preadipocitos y disminuyendo en adipocitos maduros. Así, la disminución de AhR se ve acompañada por una diferenciación morfológica y la expresión de genes relacionados con el adipocito maduro ([8111]).

De todo lo expuesto se deduce que AhR es un factor clave en una amplia variedad de procesos fisiológicos endógenos, así como de respuestas a compuestos exógenos. Esta respuesta es dependiente del tipo celular, del tejido y posiblemente de la especie y puede ser compleja debido a la promiscuidad de unión a diferentes ligandos con estructura y actividad diferentes. Así, existen múltiples agonistas endógenos con diversidad estructural en diferentes

tejidos y en distintos periodos del desarrollo, siendo un importante reto de futuro el identificar el espectro de estos ligandos así como su papel fisiológico ([8104]).

A diferencia de lo que ocurre con el mecanismo de acción de AhR, que ha sido ampliamente estudiado, los factores y eventos que controlan la expresión de ARNm y proteína de este factor aún son poco conocidos. Además, en la literatura existen resultados contradictorios. Así, algunas isoflavonas, como el diadzein, disminuyeron los niveles de CYP1A1 y CYP1B1 así como la actividad EROD en microsomas hepáticos de ratón tratados semanalmente con DMBA a bajas concentraciones, a la vez que redujeron los niveles de ARNm de AhR ([6649]). Por otra parte, se ha descrito que las proteínas de la soja disminuyeron la expresión de CYP1s en hígado y glándula mamaria de rata a la vez que aumentaron los niveles de ARNm de AhR y disminuyeron los de las proteínas AhR y ARNT, sugiriendo que esta dieta ejerció un efecto sobre la transcripción y estabilización del ARNm de AhR ([6969]). Estos resultados serían similares a los observados en este trabajo para el grupo de la dieta de aceite de oliva, en el que se hallaron altos niveles de ARNm de AhR, en comparación con los otros dos grupos experimentales, sin correlación con los niveles de proteína, que en general fueron inferiores a los niveles del grupo de aceite de maíz.

Además, algunos trabajos han determinado que los niveles basales de proteína AhR están regulados por un mecanismo ubiquitina-proteosoma ([8112]). Sin embargo, otros han descrito que durante la diferenciación *in vitro* e *in vivo* de los adipocitos, la disminución de la proteína de AhR se vio acompañada por la disminución de los niveles de ARNm y que la inhibición de la actividad proteasomal no afectó la cantidad de proteína en los adipocitos maduros ([7852]).

Con respecto a la regulación por parte de Nrf2 de las XMEs de fase II estudiadas, GSTP1 y NQO1, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los niveles de ARNm de estas enzimas no correlacionaban con los de la retención citoplasmática del factor de transcripción, excepto a 100 d.e. A esta edad la menor retención de Nrf2 en el citoplasma detectada en el grupo de aceite de oliva estaría de acuerdo con los mayores niveles de ARNm de GSTP1. Por otro lado, tal como sucedió con AhR, la dieta de aceite de oliva, en general, aumentó los niveles de ARNm de Nrf2, aunque el efecto fue menor. Y del mismo modo, los niveles de proteína de Nrf2, en general, tampoco reflejaron las diferencias a nivel de ARNm. En este sentido, diversos autores han descrito la regulación post-transcripcional de Nrf2 como

un proceso complejo y poco conocido. Este tema será ampliamente discutido en el siguiente apartado de esta Discusión.

La actividad transcripcional de Nrf2 está sujeta a una compleja regulación en la que intervienen múltiples vías de señalización convergentes. Se ha descrito que el mecanismo regulador de Nrf2 pueda ser dependiente tanto de los compuestos químicos como del tipo celular ([6852]). La regulación de la actividad de Nrf2/Keap1 parece estar influenciada o corregulada por otras vías de señalización. Así, la familia de las MAPKs generaría una cascada de fosforilaciones que modularían la translocación de Nrf2 al núcleo. En concreto, la cascada JNK puede ser activada en respuesta a señales de estrés como UV, radiaciones gamma, radicales libres y citoquinas inflamatorias y dicha activación acaba con la fosforilación de factores de transcripción como c-Myc, Elk-1, c-Jun y ATF-2, responsables últimos de cambios en la expresión génica ([8113]). Por otro lado, la vía de p38 puede verse activada por diferentes señales de estrés de tipo fisiológico y ambiental como citoquinas proinflamatorias, endotoxinas, *shock* térmico, radiación UV e hiperosmolaridad ([8114]). La vía de ERK5 también puede ser activada por una serie de compuestos que generan un estrés celular a través de la activación de factores como Ras, Src y PKC, aguas arriba de esta vía de señalización. Dado que las MAPKs pueden ser activadas por un amplio rango de factores, estas cascadas de señalización pueden funcionar como un mecanismo común, que se integraría con otras vías de señalización para controlar la respuesta a diversos estímulos extracelulares, entre ellos agentes quimiopreventivos de la dieta ([6852]). Así, diversos estudios han demostrado que algunos compuestos de la dieta que presentan un efecto estimulador de la actividad de Nrf2, también presentan relación con estas vías de MAPKs, entre ellas, ERK2, JNK1 y p38. De esta forma ejercerían un efecto modulador de la translocación al núcleo de Nrf2 activado y de la estabilidad de la proteína Nrf2 durante la expresión de las enzimas inducidas por factores quimiopreventivos ([8080], [8115]). Por otro lado, las MAPKs podrían jugar un papel indirecto sobre la fosforilación de coactivadores transcripcionales, como p300 y PBP ([7392], [8116]). Otra vía de señalización implicada en la regulación de Nrf2 es la de PKC, una familia de serina-treonina quinasas que fosforila una serie de proteínas implicadas en crecimiento y diferenciación celular. PKC podría estar implicada en la fosforilación de la serina 40 de Nrf2, en la región de interacción con Keap1. Esta fosforilación podría ser necesaria para la liberación del complejo pero no para su translocación al núcleo, su estabilidad o su actividad transcripcional en las regiones ARE ([7392], [8117], [8118]). Muchos detalles sobre los mecanismos moleculares de la regulación

de este factor de transcripción están aún por resolver. Entre ellos se encuentran la existencia de una señal química común entre la amplia variedad de factores quimiopreventivos capaces de activar la respuesta transcripcional de Nrf2; la existencia de un sensor celular para estos compuestos activadores; el mecanismo por el cual la señal química activa estas vías de transducción; el papel de estas vías de transducción de señal en la regulación de la actividad de Nrf2; y la regulación de la proteína de Nrf2 mediante fosforilación, ubiquitinación, u otros mecanismos ([6852]).

Los datos obtenidos a cerca del efecto estimulador de la dieta de aceite de oliva sobre los niveles de ARNm tanto de AhR como de Nrf2 resultaron, a priori, paradójicos, ya que en muchos aspectos estos dos factores de transcripción tienen acciones contrapuestas. Sin embargo, se ha descrito que los compuestos fenólicos, presentes en el aceite de oliva virgen extra, son compuestos bifuncionales y/o mixtos, capaces de activar tanto la fase I como la fase II del metabolismo de xenobióticos. En la dieta se han identificado tanto compuestos inductores monofuncionales, capaces de ejercer una acción estimuladora de las enzimas de fase II a través de Nrf2, compuestos bifuncionales, los cuales mediante la interacción con AhR son capaces de activar tanto la fase I de forma directa como la fase II indirectamente, y también compuestos mixtos, con capacidad de interacción con ambos factores de transcripción ([7254]). Dentro de los inductores de Nrf2 se han descrito compuestos fenólicos como fenoles y flavonoides, compuestos sulfurados como isotiocianatos y organosulfuros, y otros compuestos del tipo indoles, diterpenos, cumarinas, lactonas y compuestos inorgánicos como selenio ([6852]).

Con respecto a la situación presentada en la glándula mamaria, el patrón de expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 fue similar al del hígado a los 36 y 51 d.e., de manera que el grupo de la dieta de aceite de maíz presentó niveles superiores a los otros dos grupos experimentales. En el caso de CYP1B1 a 51 d.e. todos los grupos presentaron unos niveles similares de ARNm. En cambio, a 100 d.e., a diferencia de lo ocurrido en hígado, el grupo alimentado con la dieta de aceite de oliva fue el que presentó mayores niveles de expresión tanto de CYP1A1 como de CYP1B1. En cuanto a las enzimas de fase II, en la glándula mamaria únicamente se observó una disminución de los niveles de ARNm de GSTP1 a 36 y 100 d.e. debido a la dieta de aceite de maíz. Estos resultados sugieren que en este tejido los lípidos de la dieta no ejercerían un efecto importante sobre la expresión de las enzimas de fase II.

El posible efecto de los factores dietéticos sobre las XMEs en la glándula mamaria ha sido poco estudiado. Trabajos *in vivo* en ratas alimentadas con zumos de remolacha o de manzana han descrito una baja influencia sobre la expresión y actividad constitutiva de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, así como de GST y NQO1, en situaciones previas al tratamiento con DMBA ([8054], [8055]). Otros autores han mostrado que en glándula mamaria los niveles de ARNm de los CYP1s no se modificaban por efecto de dietas ricas en proteínas de la soja, mientras que extractos de proteínas séricas de leche bovina aumentaron los niveles de CYP1B1. Sin embargo, tras la inducción con DMBA, los niveles de ARNm y proteína de CYP1A1, 1A2 y 1B1 en la glándula mamaria fueron inferiores en los grupos de proteínas de la soja y la leche comparados con el grupo control ([6969]).

Estudios *in vitro*, con células de cáncer de mama MCF-7, han relacionado el efecto protector de licopeno, un compuesto de la familia de los carotenos procedente de frutas y verduras rojas, con una disminución de la actividad EROD y de los niveles de ARNm de CYP1B1. También parecieron verse aumentados los niveles de UGT1A1. Estos efectos fueron independientes de la acción de AhR ([7390]). Del mismo modo, el eugenol, en células MCF-7, podría inhibir la acción genotóxica del DMBA a través de la disminución de los niveles de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 y de la actividad EROD, posiblemente inhibiendo la unión de AhR a las regiones XRE lo cual disminuiría la transcripción génica dependiente de AhR. El eugenol también aumentó la expresión de NQO1 a la vez que incrementó la unión de Nrf2 a las regiones ARE del promotor del gen. De esta forma, este factor actuaría disminuyendo la fase I y aumentando la fase II ([6638]). Otros estudios en células MCF-7 han detectado una inhibición de la actividad EROD en células tratadas con naringenina y DMBA, mientras que el tratamiento único con naringenina no produjo disminución del ARNm de CYP1B1 ([8052]). En células MCF-7 y SKBR-3, los polifenoles del cacao aumentaron la expresión del ARNm de CYP1A1 tras las 24 horas del tratamiento. Además, se observó un retraso entre el gran aumento del ARNm producido a las 24 horas y el aumento de los niveles de proteína a las 48 horas o a las 72 horas según el tipo celular ([8051]). Trabajos realizados con resveratrol y genisteína han demostrado en células MCF-10A un efecto modulador de la expresión de CYP1A1 y CYP1B1 ([6765], [6766]).

En general, la mayoría de los trabajos indican que mientras que la expresión constitutiva de las XMEs en la glándula mamaria no parece sufrir grandes cambios por efecto de la dieta en situación basal, el mismo tratamiento combinado con la administración de

PAHs como el DMBA, o en cultivos celulares de células malignizadas, parece ejercer un efecto inhibitor de las CYP1s o activador de las XMEs de fase II.

Por tanto, cabe la posibilidad de que la regulación de XMEs en la glándula mamaria sea compleja e implique otros factores. Ya se ha descrito la existencia de una regulación hormonal de la expresión constitutiva de CYP1B1 en tejidos esteroideogénicos, como la corteza adrenal, el ovario y los testículos ([8119]). Así, los estrógenos pueden inhibir la inducción de CYP1A1 y CYP1B1, a través de la disminución de los niveles de proteína de AhR y ARNT. Otros trabajos han demostrado una disminución de la expresión del ARNm de ARNT durante la fase estro del ciclo estral de la rata, lo que demuestra la importancia de las hormonas sobre la regulación de este cofactor. Además, dado que AhR y ER α interactúan con los mismos cofactores nucleares, principalmente ARNT, durante la regulación transcripcional, los estrógenos podrían antagonizar la acción de AhR durante la inducción de los CYP1s ([6741], [6969], [7854]). Por otro lado, los estrógenos podrían regular directamente la expresión de estas enzimas dado que en la región promotora de CYP1B1 se ha localizado una región funcional de respuesta a estrógenos (*estrogen response element*, ERE) ([8120]). La compleja regulación de los CYP1s en la glándula mamaria radica en que estas enzimas están implicadas en el metabolismo de los estrógenos. Así, CYP1A1 y CYP1B1 producen la hidroxilación de estrógenos en las posiciones C2 y C4, respectivamente. Estos compuestos oxidados generan un mayor estrés oxidativo durante la formación de las correspondientes formas quinona y semiquinona, generando daño celular e induciendo transformación maligna ([7208], [7215]). Además, la importancia de CYP1B1 en el tejido mamario se basa en que tanto los derivados 4-OH catecol estrógeno, como los metabolitos activos del DMBA son de mayor poder genotóxico que los producidos por el resto de CYP1s ([6742], [8069]).

Finalmente, tal como se realizó en el estudio sobre la ontogenia de las XMEs (apartado A de esta Discusión), con el fin de obtener una visión global de los resultados, se realizó el análisis de la ratio fase I/fase II. La importancia de esta relación entre las XMEs de fase I y la fase II ha sido previamente corroborada por otros autores. Así, el efecto general perseguido en el tratamiento preventivo del efecto carcinogénico de la exposición a xenobióticos sería una disminución de la fase I acompañada por un aumento de la fase II ([6540]). En este trabajo, el balance entre fase I y fase II fue estudiado con el objetivo de clarificar el efecto diferencial de las distintas dietas, en cada uno de las edades estudiadas,

sobre el metabolismo del DMBA. En hígado, el perfil hallado en el grupo de animales alimentados con la dieta rica en aceite de maíz estaría a favor de una mayor formación de compuestos reactivos respecto a los otros grupos en todas las edades estudiadas. En cambio, los grupos control y de dieta de aceite de oliva presentaron valores similares. En la glándula mamaria, este mismo patrón se repitió a los 36 d.e., pero no se mantuvo en el resto de edades, donde no se hallaron diferencias significativas, a pesar de que el grupo de dieta rica en aceite de maíz tendió a presentar valores inferiores a los otros dos grupos, que presentaron valores similares entre sí 51 y 100 d.e.

De este modo, se podría hipotetizar que en hígado a 51 d.e., edad importante por ser previa a la administración del DMBA, la dieta rica en aceite de maíz habría modificado el balance fase I/fase II de manera que se favorecería la generación de un mayor número de metabolitos activos tras la posterior administración del DMBA, capaces de generar daño genotóxico tanto en el propio hígado como en otros tejidos. En la glándula mamaria, en cambio, alrededor del inicio de la pubertad, a 36 d.e., la dieta podría también ejercer un efecto modulador sobre la expresión de las XMEs, pero, sin embargo, dicho efecto se perdería con el proceso de maduración de la glándula, donde otros factores, probablemente hormonales, podrían tener más importancia que la dieta a la hora de modular dichas enzimas. En cualquier caso, no puede descartarse un efecto de la dieta sobre la metabolización de xenobióticos en la glándula mamaria al recibir el insulto carcinogénico, dado que tal como se ha citado anteriormente, diversos autores han demostrado un efecto coordinado entre componentes dietéticos y situaciones de estrés, como lo sería la administración del DMBA.

Cabe también considerar la posibilidad de que la dieta podría estar ejerciendo en la glándula mamaria otros efectos que facilitarían el efecto genotóxico de PAHs sobre este tejido a través de otros mecanismos. Entre ellos destacaría el papel del tejido adiposo como tejido bioacumulador de xenobióticos lipofílicos, así como el adelanto de la pubertad que producen las dietas hiperlipídicas, especialmente la de aceite de maíz ([6887]). De esta manera, el periodo de mayor susceptibilidad a la transformación neoplásica se avanzaría, dado la elevada tasas de proliferación de las células epiteliales mamarias durante este periodo.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, se podría postular que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, rica en PUFA n-6, supondría un factor de riesgo frente a la exposición a xenobióticos al aumentar la susceptibilidad a los efectos carcinogénicos de estos. Así, la influencia de los PUFA n-6 sobre el aumento de expresión, principalmente hepática, de

las XMEs de fase I en todas las edades, especialmente importante a 51 d.e. por tratarse de la situación previa a la administración del DMBA, junto con el posible aumento de la actividad global de citocromos hepáticos, anteriormente descrito, podría resultar en una alta formación de compuestos reactivos tras la exposición a PAHs. Además, otros efectos de las dietas ricas en aceite de maíz sobre la glándula mamaria, entre ellos el aumento de tejido adiposo general que serviría como tejido bioacumulador de xenobióticos lipofílicos, y el aceleramiento de la pubertad ([6887]) que desplazaría la ventana de mayor susceptibilidad a la transformación neoplásica de este tejido, supondrían un aumento de la susceptibilidad a compuestos carcinogénicos exógenos.

Por otra parte, la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra, a pesar de presentar un alto contenido lipídico, en general presentó valores de expresión de las XMEs similares a los del grupo control en ambos tejidos. Así, su composición lipídica, rica en ácido oleico, y su alto contenido en compuestos minoritarios, principalmente compuestos antioxidantes de tipo fenólico, podrían ejercer un efecto beneficioso, que podría contrarrestar el alto contenido energético de estas dietas en este modelo experimental, y que podría estar relacionado con el menor riesgo de cáncer en humanos asociado al consumo de las dietas normolipídicas ricas en aceite de oliva, de manera destacada, la Dieta Mediterránea.

Tras la obtención de estos resultados, obtenidos en la serie experimental 1, y con el objetivo de comprobar las hipótesis generadas, se desarrolló la serie experimental 2, cuyos resultados serán discutidos a continuación.

C. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL METABOLISMO DEL DMBA.

Tras los resultados obtenidos en la serie experimental 1 y las hipótesis generadas sobre el efecto diferencial de las dietas de aceite de maíz y de aceite de oliva sobre el metabolismo del DMBA, como mecanismo de sus distintas acciones moduladoras de la carcinogénesis mamaria experimental, se desarrolló una segunda serie en la cual se investigaron específicamente los efectos de dichos lípidos sobre la metabolización del carcinógeno en las horas siguientes a su administración, así como la formación de compuestos reactivos genotóxicos y el daño generado en el ADN.

Al estudiar la expresión de ARNm de las XMEs de fase I en hígado, los resultados mostraron que el patrón de expresión de CYP1A1 y CYP1B1 a 52 d.e. era idéntico al observado a 51 d.e. en la serie experimental 1. Así, la dieta rica en aceite de maíz aumentó la expresión de ambas enzimas en comparación con la dieta de aceite de oliva y la dieta control. Además, los niveles de retención citoplasmática de AhR estuvieron en consonancia con estos resultados ya que el grupo $2M_i$ presentó valores de retención inferiores a los otros dos grupos. Por el contrario, la actividad EROD determinada en este tejido presentó un perfil discordante con el de ARNm, de manera que el grupo de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz presentó los niveles más bajos de actividad comparado con los otros dos grupos.

La administración del DMBA supuso un importante aumento de la expresión de los dos CYP1s estudiados en esta serie experimental, siendo mucho mayor el aumento observado en los niveles de ARNm de CYP1A1 que los de CYP1B1. Este incremento fue superior en los grupos experimentales de las dietas control y de aceite de oliva que en el grupo de dieta rica en aceite de maíz, especialmente en las primeras horas post-inducción. Estos aumentos de expresión se podrían relacionar con el pequeño descenso de los niveles de retención citoplasmática de AhR detectado, siendo mayor este descenso para los grupos $2C_i$ y $2O_i$ que para $2M_i$. De nuevo, contrariamente a lo esperado, los niveles de actividad EROD no correlacionaron con los niveles de ARNm detectados en los diferentes grupos experimentales al compararlos entre sí en un mismo tiempo post-inducción. Así, a las 12 horas tras la administración del carcinógeno, contrariamente a lo observado en los niveles de ARNm, fue el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz el que presentó los niveles de actividad EROD mayores.

Tras este importante aumento tanto de la expresión de ARNm como de la actividad de las XMEs en el hígado dentro de las 12 primeras horas tras la administración del carcinógeno, siguió un descenso paulatino de ambos parámetros hasta alcanzar una situación similar a la basal en todos los grupos alrededor de los 63 d.e., 10 días después de la inducción, en el caso de los niveles de ARNm, y 58 d.e., 5 días después de la inducción, en el caso de la actividad enzimática. Este descenso tanto de ARNm como de actividad fue más rápido en el grupo de la dieta de aceite de maíz que en los otros dos. El inicio de este proceso se podría relacionar con el aumento de la retención citoplasmática de AhR detectado a las 24 horas tras la administración del carcinógeno, que podría desencadenar el descenso progresivo de los niveles de ARNm.

Cabe destacar que en los grupos de animales control, se pudo observar que la administración del vehículo (1 mL de aceite de maíz) también generó un efecto sobre la expresión y la actividad de los CYP1s en el hígado, aunque a una escala muchísimo menor que el carcinógeno. Así, en todos los grupos la expresión de ARNm de CYP1A1 aumentó ligeramente tras la administración del vehículo, repitiéndose, a menor escala, el patrón observado en los animales inducidos con DMBA a las 12 horas de la inducción. El grupo $2M_s$ fue el que presentó los niveles más bajos. En cambio, la expresión de ARNm de CYP1B1 disminuyó ligeramente en todos los grupos. Por su parte, la actividad EROD, aumentó ligeramente a las 12 horas post inducción en el grupo $2M_s$, mientras que en los grupos $2C_s$ y $2O_s$ disminuyó. De este modo, el grupo alimentado con la dieta de aceite de maíz mostró mayor actividad EROD que los otros dos grupos, siendo este patrón similar al observado a las 12 horas en los animales inducidos aunque a una escala muy inferior. Estos pequeños cambios observados en la expresión y actividad de los CYP1s de los animales sanos por efecto del vehículo se recuperaron rápidamente tras su administración.

Analizando en detalle los cambios de expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 y de actividad EROD en los animales inducidos, se constató que existía una correspondencia entre los patrones de expresión de ARNm a 52, 53.5 y 54 d.e. con los patrones de actividad a 53.5, 54 y 55 d.e., respectivamente. Así, los mayores niveles de expresión del grupo de aceite de maíz a los 52 d.e. se correspondieron con los mayores niveles de actividad de este grupo a 53 d.e., y así sucesivamente con el resto de edades. En los animales sanos esta situación también pareció repetirse entre el ARNm a 52 d.e. y la actividad a 53.5 d.e. Los resultados

sugieran, por tanto, la existencia de un retraso o desfase entre los patrones de expresión de ARNm y los de actividad enzimática.

Del mismo modo que sucedió en la serie experimental 1, la expresión de las enzimas de fase II estudiadas en este trabajo mostró una menor influencia por efecto de los lípidos de la dieta que los CYP1s. NQO1 fue, de las dos enzimas de fase II estudiadas, la que presentó mayores variaciones, debidas tanto a la administración del carcinógeno como al efecto de la dieta. Así, se observó que a las 24 horas previas a la administración del DMBA (52 d.e.) el grupo control presentó niveles de ARNm de NQO1 superiores a los otros dos grupos. Tras la inducción en todos los grupos experimentales se produjo un aumento de la expresión de ARNm, volviendo a una situación próxima a la de 52 d.e., aproximadamente a las 48 horas post-inducción (55 d.e.). Durante este periodo, en general, fue el grupo control el que presentó mayores niveles de ARNm, seguido del grupo de aceite de oliva virgen extra y, finalmente, del de aceite de maíz. La actividad de NQO1, a 52 d.e. también presentó menores niveles en el grupo de dieta rica en aceite de maíz en comparación con los otros dos grupos, presentando así concordancia con los niveles de ARNm a esta misma edad. Por otra parte, la administración del DMBA provocó una respuesta más lenta de la actividad enzimática que del RNAm. Así, mientras que el pico más alto de niveles de ARNm se observó a las 12 horas post-inducción, el pico de mayor actividad se observó a las 48 horas post-inducción. Esta fue una situación similar a la ya descrita para las XMEs de fase I. Sin embargo, en este caso, el perfil de actividad NQO1 presentó, en general, una situación similar a la del ARNm, siendo el grupo de dieta control el que mostró niveles superiores a los otros dos, seguido, en la mayoría de las edades estudiadas, por el grupo de dieta rica en aceite de oliva virgen extra y por el de dieta de aceite de maíz.

Por su parte, GSTP1 presentó, en general, escasas variaciones tanto de sus niveles de ARNm como de actividad. La dieta y la administración del DMBA ejercieron efectos poco importantes, con la excepción de un aumento de la expresión en el grupo control tras la administración del carcinógeno, alcanzando los mayores niveles a las 48 horas post-inducción. Sin embargo, estos efectos no se vieron reflejados en los niveles de actividad de GST, de manera que se observaron pequeños cambios tanto por efecto de la dieta como por el efecto de la inducción con el DMBA.

En relación a los animales sanos, no inducidos con el carcinógeno, se observó que el vehículo prácticamente no ejerció ningún efecto sobre la expresión y actividad de los enzimas

de fase II. Únicamente se produjo un ligero descenso de los niveles de ARNm de NQO1 a las 12 horas post-inducción, que volvieron a la normalidad a las 24 horas post-inducción. En el caso de GSTP1, no se observó ningún efecto significativo. Tampoco se observaron cambios debidos a la administración del vehículo en ninguna de las actividades enzimáticas de las XMEs de fase II.

Los cambios observados en las XMEs de fase II no parecieron estar directamente relacionados con el grado de retención citoplasmática del factor de transcripción Nrf2. Mientras que GSTP1 apenas sufrió cambios de expresión, NQO1 presentó un perfil de expresión que podría considerarse dual. Así, a los 52 d.e., situación previa a la inducción, la expresión de ARNm de NQO1 en los distintos grupos podría relacionarse con la retención citoplasmática observada para Nrf2, de manera que el grupo de aceite de maíz presentó mayores niveles de retención citoplasmática de Nrf2 y menor expresión del ARNm de NQO1. En cambio, tras la inducción con DMBA, el perfil de expresión del ARNm de NQO1 en los distintos grupos experimentales fue similar al observado para las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 en las primeras horas post-inducción, aunque a una escala menor, con expresión de ARNm inferior en el grupo $2M_i$ comparado con los otros dos. Ello sugeriría, por tanto, una mayor influencia sobre la regulación de la expresión de NQO1 por AhR que por Nrf2, durante este periodo post-inducción. Dado que, como ya se ha explicado en la Introducción, la regulación de NQO1 podría ser dependiente de ambos factores de transcripción debido a la existencia tanto de secuencias XRE como ARE en la región promotora de esta enzima, se podría hipotetizar la existencia de una compleja regulación coordinada entre AhR y Nrf2 que sería diferente en situaciones basales o ante una situación de estrés, como la administración de un carcinógeno.

Además, tal como se ha ido describiendo a lo largo de esta Discusión, se ha observado que frecuentemente, tanto en éste como en otros trabajos, se han descrito situaciones en las cuales los niveles de ARNm y proteína no han presentado una relación directa. Esta situación se ha encontrado tanto para las XMEs como para sus factores de transcripción. Se podrían sugerir diversas justificaciones técnicas y metodológicas que explicasen esta falta de correspondencia, sin embargo también existe un importante campo de investigación sobre la modulación de los niveles totales de proteína activa dependiendo del inicio de la transcripción, modulado por diferentes factores, la estabilización, traducción y degradación del ARNm, así como, por la posterior regulación de la actividad y degradación de las proteínas. Otros autores

ya han postulado la complejidad de la regulación transcripcional de las XMEs debido al amplio número de trabajos en los que se ha observado este efecto discordante entre el ARNm y su correspondiente proteína. Se ha apuntado la necesidad de investigar la regulación de la síntesis, estabilización y degradación del ARNm así como del *turn-over* o renovación de la proteína ([8037], [8048]).

La producción y el mantenimiento de las proteínas en la célula requiere una importante serie de procesos conectados, que abarca desde la transcripción, el procesado y la degradación del ARNm hasta la traducción, localización, modificación y degradación programada de las proteínas. Los niveles de proteína en la célula reflejan un balance dinámico entre todos estos procesos ([8036], [8037]). En casi todos los organismos, los niveles basales de abundancia de ARNm solo predicen en parte los niveles basales de proteína ([8121]). Así, la abundancia relativa de la proteína puede o no ocurrir en proporción con los niveles correspondientes de ARNm. En células de mamíferos, el ARNm se produce en una tasa muy inferior que la producción de proteínas. De media, una célula de mamífero produce dos copias de ARNm por hora, mientras que genera docenas de copias de la correspondiente proteína por copia de ARNm por hora. De igual forma, el ARNm es menos estable que las proteínas, con una vida media de 2,6-7 horas comparado con las 46 horas de las proteínas. Sin embargo la situación para una proteína en concreto puede diferir mucho de la media descrita, teniendo en cuenta su función e importancia en la célula en un momento determinado, pudiendo existir una gran diferencia entre la importancia de la transcripción o la regulación post-transcripcional ([8122], [8124]). Así, la regulación de los niveles de ARNm a nivel transcripcional puede ser considerado como el control del estado “*on*” y “*off*” en la regulación de los niveles de proteína de manera que sólo determinados cambios en la abundancia de ARNm activan una respuesta en los niveles de proteína. Mientras que la regulación post-transcripcional, traduccional y de la degradación del ARNm, mediante la acción de miRNAs u otros mecanismos ([8126]), ha sido descrita por ejercer una regulación fina de los niveles de expresión de proteína, más que por hacer grandes cambios sobre su expresión ([8127], [8128]). En resumen, la regulación de los niveles de ARNm a nivel transcripcional podría funcionar como un interruptor, mientras que la regulación aguas abajo de la transcripción funcionaría como un reóstato para los siguientes ajustes de abundancia de proteína ([8036]). Consistente con este modelo, se ha observado que las proteínas presentan un mayor rango dinámico de concentraciones comparado con el rango de variaciones del ARNm ([8122], [8123], [8125], [8129]). Esta señal diferencial de amplificación entre ARNm y proteína debe ocurrir por

mecanismos post-transcripcionales ([8036]). La transcripción, traducción y degradación están a menudo altamente acopladas y suelen regularse las unas a las otras a través de un bucle de retroalimentación (*feedback loops*) ([8130]). En estos trabajos aún faltan por comprender los mecanismos que regulan las velocidades de producción y renovación de los niveles de proteína, el cambio de estas velocidades ante diferentes condiciones celulares y los principios que gobiernan estas regulaciones ([8036], [8037]).

La degradación, localización y traducción de ARNm forman parte de un sistema de regulación post-transcripcional multifactorial controlado por moléculas de ARNm no codificantes o miRNAs y/o por efecto de proteínas de unión al ARNm. El control post-transcripcional podría permitir una rápida y eficiente reprogramación de la expresión de genes en respuesta a cambios de las condiciones fisiológicas ([8037]). Los miRNAs podrían estar implicados en la regulación de diversos procesos biológicos como diferenciación celular, proliferación, metabolismo y apoptosis ([8039], [8131]). El patrón de expresión de los miRNA es específico de células y/o tejidos y varía en estados de desarrollo y ante diversos estímulos. Los diferentes miRNAs se unen a regiones UTR (*untranslated regions*) en la zona 3' o 5' o incluso dentro de regiones codificantes, ORF (*open reading frame*), del ARNm ([8037]). Otras regiones del ARNm ricas en secuencias AU (*AU-rich elements*, *ARE's*) pueden interaccionar con proteínas de unión a regiones *ARE's* del ARNm capaces de regular la estabilización del ARNm o promover su degradación. Recientes observaciones sobre la localización celular de moléculas de ARNm que contiene regiones *ARE's* han descrito la presencia de estructuras granulares citoplasmáticas con algunas características similares a las del exosoma que dan soporte a la idea de la existencia de estructuras celulares implicadas en el almacenamiento o degradación de distintos grupos de ARNm ([8037]).

En general, existe poca información sobre la regulación del ARNm de las XMEs y su posible modulación por factores dietéticos. De los pocos trabajos encontrados al respecto, alguno podría dar pistas sobre la importancia de este proceso en las enzimas investigadas en este trabajo. Algunos autores han descrito la presencia de regiones 3'UTR en el ARNm de CYP1B1 en humanos que podrían ser responsables de una regulación de la traducción en diferentes tejidos en humanos ([8132]). De acuerdo con estos trabajos, recientemente se ha descrito que CYP1B1 puede ser regulado a nivel post-transcripcional por el miRNA miR-27b en glándula mamaria humana ([8039]). Además, se ha observado que en tumores humanos, en comparación con tejido sano, existe una disminución de los niveles de miR-27b acompañada

de un aumento de los niveles de proteína ([8040]). Por otra parte, estudios realizados con modelos informáticos relacionan diversos miRNAs con la regulación post-transcripcional de CYP1A1 ([8039]) y atribuyen el efecto regulador de los miRNAs a la expresión específica de tejido y a las variaciones específicas de tejido de los CYPs. Estos recientes trabajos de revisión bibliográfica sobre la regulación post-transcripcional han recopilado resultados de diversos CYPs implicados en el metabolismo de xenobióticos que también sufrirían una regulación a través de miRNAs ([8040]). Además, también se ha descrito que ARNT, el cofactor de AhR necesario para la activación de la transcripción, también presenta una regulación de sus niveles de proteína a través del miR-24 en hígado de humanos. Este miRNA actuaría inhibiendo la traducción sin afectar a los niveles de ARNm. Este efecto represor de la traducción se ha asociado con una disminución de la expresión de CYP1A1 ([8133]). También se ha descrito que tratamientos con determinados xenobióticos hidrocarburos policíclicos, como TCDD y BaP, modifican la expresión de múltiples miRNAs en hígado, y de forma diferencial en pulmón, de ratones tratados ([8040]).

En el caso de Nrf2, los niveles de proteína tienen una vida media inferior a 20 minutos ([8134]), debido a la ubiquitinización y degradación relacionada con su unión a Keap1. Sin embargo, se ha observado que tras una situación de estrés en la célula se produce un rápido aumento de los niveles de Nrf2 en el núcleo, que difícilmente podrían relacionarse con los niveles de proteína Nrf2-Keap1 presentes en el citosol. Así, se han sugerido mecanismos de regulación alternativos relacionados con los sistemas post-transcripcionales ([8135], [8136]). Se ha postulado que el mantenimiento de ciertos niveles de ARNm en un estado de estabilización y represión de la traducción permitiría realizar una rápida respuesta aumentando los niveles de proteína en el momento en el que señales ambientales lo indicasen, sin necesidad de esperar a los procesos de transcripción, maduración y exportación del núcleo del ARNm. A favor de esta hipótesis se ha descrito que Nrf2 presenta una región 3'UTR reconocida por miRNAs que inhibirían la traducción ([8138]), una región 5'UTR que contendría una zona de interacción con el ribosoma sensible a la situación redox de la célula ([8137]) y, además, una región dentro de la zona 3'ORF que se postula que podría estar relacionada con la interacción con proteínas de unión a ARNm u otros factores reguladores de la traducción relacionados con el mantenimiento de los niveles de ARNm en un estado quiescente ([8041]).

Por otra parte, los niveles de proteína también pueden presentar una regulación posterior a la traducción, y así tanto la actividad como su degradación y/o estabilización pueden estar relacionados con varios factores. La degradación proteolítica, en general, necesita de modificaciones post-traduccionales que sirvan de señal molecular. Éstas incluyen conjugación con ubiquitina (Ub) o ubiquitinización, uniones bisulfito con grupos glutatión (GSH), oxidaciones de residuos His, Cys o Met, fosforilaciones y/o desfosforilaciones, desamidación y glicosilación. Las principales vías de degradación proteica son la vía proteasomal dependiente de Ub, la vía relacionada con proteasas dependientes de calcio, como quinasas y calpains, y la vía de degradación lisosomal. Muchos autores han demostrado que diferentes isoformas de CYPs son degradadas por vía lisosomal o proteasomal, a menudo dependiendo de la presencia o no de su sustrato ([8042]). Además, las diferentes modificaciones post-traduccionales pueden estar influyendo no sólo sobre su degradación sino también sobre su estabilidad y actividad. Diversas modificaciones covalentes, que incluyen eliminación de péptidos señales, fosforilaciones, nitraciones, glicosilaciones, metilaciones, sulfataciones, acetilaciones y prenilaciones, pueden presentar un papel fisiológico de estas modificaciones sobre las enzimas ([7386]).

Savas U y Jefcoate CR ([7382]) describieron por primera vez la posible diferencia entre los niveles de ARNm y proteína para CYP1B1 en trabajos *in vitro*. A pesar de que se planteaban diversas posibilidades, entre ellas la ya descrita regulación prost-transcripcional del ARNm, en este trabajo se destacó el efecto de la estabilización de la proteína por efecto de la unión de un sustrato. Se observó que tratamientos con TCDD y benzo(a)antraceno (B(a)A) en células MCA y 10T1/2 producían un aumento similar de los niveles de ARNm mediado por la activación de AhR en ambos tipos celulares a las 6 horas de la administración. Además, esta expresión fue disminuyendo con el tiempo en el caso del B(a)A, y no en el caso del TCDD. Por otro lado, mientras que la vida media de la proteína de CYP1B1 en las células inducidas con TCDD fue de 3-4 horas, en el caso de las células tratadas con B(a)A fue de alrededor de 24 horas. El hecho de que el TCDD no sea sustrato de la proteína y sí lo sea el B(a)A, justificaría el aumento de la vida media de la proteína como consecuencia de una estabilización de la misma por unión al sustrato, pudiendo aumentar los niveles de ésta del orden de 5 a 10 veces sin afectar los niveles de ARNm. Además, la eliminación del B(a)A debido a su metabolismo haría descender la expresión de ARNm del CYP1B1 a lo largo del tiempo, mientras que se mantendría elevada en el caso del TCDD, como ya observaron estos autores ([7382]). En trabajos más recientes, se ha demostrado que la degradación de CYP1B1

es debida principalmente a la vía proteasomal tras su reconocimiento debido a una fosforilación o una ubiquitinización previa, a pesar de que no se han descartado otras posibles vías que controlen el rápido *turn-over* de CYP1B1. Además la relación entre síntesis y degradación de la proteína podría ser específica de tejidos y tipos celulares ([7388]). Por otra parte, algunos autores han descrito la degradación de CYP1A1 posiblemente relacionada con la vía lisosomal ([7382], [8042]). La fosforilación de los CYPs ha sido descrita en general como una vía de inactivación y señal de degradación de estas enzimas. Además, se ha demostrado que AhR también podría modificar su capacidad transcripcional a través de su fosforilación, lo que regularía su unión con ARNT en el núcleo. Se ha descrito que la actividad de proteínas quinasas y fosfatasas podría ser modulada por una variedad de factores endógenos y exógenos, incluyendo factores hormonales, dietéticos, neurotransmisores y fármacos pudiendo ejercer un efecto sobre la actividad de los CYPs ([8048]). Algunos compuestos, derivados indoles del β -carbolino, procedentes de plantas medicinales como la *Peganum harmala* y la *Banisteriopsis caapi*, han presentado efectos inhibidores de la actividad CYP1A1 a través de un efecto post-transcripcional sobre la degradación proteasomal de esta enzima ([8045]). Por otro lado, dentro de la regulación de las enzimas de fase II, NQO1 también ha sido descrita por sufrir una regulación de los niveles de proteína a través de su degradación mediada por la vía ubiquitina-proteosoma ([8043]). En este trabajo se describe que la vida media del ARNm de NQO1 en situación normal *in vitro* varía alrededor de las 30 horas, sin embargo la vida media de la proteína es de unas 24 horas.

Otras modificaciones descritas han destacado un efecto sobre la modificación de la actividad de CYP1A1 mediada por la exposición a metales pesados como el plomo, debido a una activación de la enzima Hemo Oxigenasa 1, que produce una modificación del grupo hemo del CYP1A1, disminuyendo su actividad ([8044]). Otras modificaciones post-transcripcionales como la S-Nitrosación, unión de un grupo NO con el grupo tiol del aminoácido Cys, puede ser responsable de una acción activadora o inhibidora de la función de diversas enzimas. Así, en el caso de GSTP1, ha sido descrita su acción sobre la desestabilización e inactivación de la proteína ([8046]).

En conjunto, todas estas evidencias experimentales, junto con los resultados obtenidos en la serie experimental 1, han llevado a la siguiente hipótesis para explicar los resultados de la serie experimental 2. Así, la expresión de ARNm de las enzimas de fase I a 52 d.e. estaría aumentada en el grupo de dieta rica en aceite de maíz mediante un posible efecto del ácido

linoleico, y su implicación en el metabolismo de prostaglandinas, que activaría la transcripción mediada por AhR. Del mismo modo, los niveles de proteína y de ARNm podrían estar modulados a nivel post-transcripcional mediante alguno de los mecanismos anteriormente descritos, de forma que la actividad de estas enzimas no estaría directamente relacionada con sus niveles de ARNm. La dieta podría ejercer algún tipo de efecto modulador sobre este proceso, desconocido por el momento. Tal como se ha descrito anteriormente, una estabilización y acumulación del ARNm favorecería una respuesta rápida de la célula ante una situación de estrés en la que fuese necesaria la actuación rápida de las XMEs. Así, en este trabajo, la administración del DMBA generaría dicha situación de estrés que haría que los niveles de ARNm acumulados se tradujesen a proteína, y que esta proteína, por la existencia de su sustrato, aumentase su vida media, anteriormente descrita muy corta para el caso de los CYP1s. Así, durante las 12 primeras horas tras la administración del DMBA se iniciaría su rápida metabolización. Esta respuesta de actividad EROD se produjo de forma más rápida en el grupo de aceite de maíz dado que en la situación previa a la administración del DMBA (52 d.e.) los niveles de CYP1A1 y CYP1B1 eran superiores en este grupo con respecto a los otros dos. Por otro lado, al mismo tiempo que se iniciaría su metabolismo de forma rápida debido a la reserva de ARNm, se iniciaría también la activación de la transcripción de los genes modulados por AhR como resultado de su unión al DMBA. Así, dado que la metabolización habría sido más rápida en el grupo de aceite de maíz, podría postularse que los niveles de DMBA total no metabolizado disminuirían más rápidamente. De este modo, la activación de AhR y de la transcripción de CYP1A1, CYP1B1, y NQO1 en este trabajo, fue menor en este grupo, al compararlo con los otros dos. En cualquier caso, la inducción de dichos enzimas fue igualmente importante dada la elevada cantidad de DMBA (10 mg) administrada por animal. Tras este primer pico de activación, tanto de la actividad como de la expresión de las XMEs, debido a la administración del DMBA, los niveles de expresión y actividad de todas las enzimas se irían regulando según disminuyese la presencia de los agentes que las indujeron, en este caso el propio DMBA. Esta disminución estaría regulada, igual que su activación, por los distintos mecanismos transcripcionales y traduccionales. Dicho proceso ocurriría de forma rápida y coordinada con los niveles de DMBA, con el objetivo de evitar los posibles efectos perjudiciales de una sobreexpresión innecesaria y no controlada de las XMEs, principalmente de las enzimas de fase I, peligrosas para la célula por su facilidad para generar compuestos oxidados perjudiciales o tóxicos a partir de sustratos endógenos, como el caso de los estrógenos, o por su implicación en otras vías metabólicas, como el caso del metabolismo de prostaglandinas. Así, dado que el grupo de la dieta rica en aceite de maíz generó un

metabolismo del DMBA más rápido que las otras dietas, la expresión y actividad de las XMEs también disminuyó más rápidamente, en comparación con los otros dos grupos. Por otro lado, la correcta combinación y/o coordinación entre las enzimas de fase I y fase II en la respuesta a xenobióticos debería estar altamente regulada. Así, una apropiada velocidad de generación de metabolitos activos en la célula debería ir acompañada de una rápida inactivación de los mismos por parte de las enzimas de fase II con el fin de evitar la salida al torrente sanguíneo, y por consiguiente la llegada a otros tejidos, de compuestos reactivos y teratogénicos. Así, en este trabajo, una rápida metabolización del DMBA por parte de los CYP1s debería ir acompañada por una rápida inactivación de los metabolitos activos por parte de los XMEs de fase II. La respuesta EROD ligeramente retrasada en los grupos control y de aceite de oliva comparados con la rápida actividad en el grupo de aceite de maíz, acompañada por mayores niveles de actividad NQO1 en estos dos grupos, ${}_{2}C_i$ y ${}_{2}O_i$, podrían ser responsables de una respuesta a nivel hepático más controlada y una menor liberación de compuestos activos a la sangre, en estos dos grupos experimentales.

Esta hipótesis pudo ser contrastada experimentalmente en la serie experimental 2, gracias a los resultados obtenidos del análisis de los niveles de DMBA y de sus metabolitos en el plasma, así como de la detección del daño genotóxico en la glándula mamaria mediante el análisis de los aductos DMBA-ADN en este tejido. Así, los niveles de DMBA en plasma a las 12 horas post-inducción fueron inferiores en el grupo de aceite de maíz, en comparación con los otros dos grupos, lo que estaría de acuerdo con una mayor metabolización a nivel hepático. Además, los niveles plasmáticos de los tres metabolitos del DMBA analizados en este trabajo, 3-OH-DMBA, 3,4-diOH-DMBA y 12-OH-Me-7-MBA, fueron superiores en los animales del grupo de aceite de maíz que en los otros dos grupos. En las siguientes determinaciones a lo largo del tiempo, los niveles de DMBA del grupo de aceite de maíz disminuyeron de forma más rápida que en los otros dos grupos, siendo los niveles muy bajos alrededor de los 55 d.e. y prácticamente indetectables a los 58 d.e., mientras que los niveles en los otros grupos experimentales presentaron una desaparición más paulatina. Además, en general, los metabolitos activos disminuyeron a lo largo del tiempo de forma similar a la disminución del DMBA. Cabe destacar que en el grupo de aceite de maíz el 3,4-diOH-DMBA, metabolito previo a la formación de los diol-epóxidos más reactivos ([7449]; [7701]; [7989]), fue el que presentó los mayores niveles en plasma a las 12 y 24 horas posteriores a la administración del DMBA. De acuerdo con estos resultados, el daño genotóxico en glándula mamaria fue, en general, superior en el grupo de la dieta de aceite de maíz en comparación

con los otros dos grupos experimentales. Así, a las 12 horas post-inducción éste fue significativamente superior comparado con el grupo de aceite de oliva virgen extra, y en todas las edades posteriores fue significativamente superior a tanto a este grupo como al control.

Por otra parte, al estudiar los niveles de ARNm AhR y Nrf2 en la serie experimental 2, se observó, al igual que sucedió en la serie 1, que los niveles de ARNm de ambos factores de transcripción fueron superiores en los grupos de dieta rica en aceite de oliva, tanto en animales sanos como inducidos, comparados con los otros dos grupos. Tal como se discutió anteriormente, los compuestos antioxidantes del aceite de oliva virgen extra podrían estar ejerciendo un efecto sobre la transcripción o la regulación post-transcripcional de estos factores de transcripción favoreciendo estos altos niveles de ARNm, cuyo significado podría ir dirigido hacia un aumento de la respuesta antioxidante de la célula. En este sentido, sería interesante realizar nuevos estudios incluyendo nuevas enzimas que ayuden a dilucidar este posible efecto antioxidante de la dieta de aceite de oliva.

En resumen, se podría concluir que el efecto ejercido por la dieta en los procesos de regulación de las XMEs de fase I y fase II podría modular la rápida respuesta que el organismo proporciona de forma fisiológica frente a la exposición a xenobióticos. Así, factores dietéticos capaces de activar una respuesta de las enzimas de fase I e inhibir, o no estimular, las de fase II causarían una mayor susceptibilidad al efecto carcinogénico de estos compuestos. En este estudio, los efectos generados por la dieta rica de aceite de maíz sobre la transcripción y posiblemente sobre la regulación post-transcripcional y post-traducciona de las XMEs implicarían una mayor susceptibilidad ante la exposición a PAHs. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, a pesar de su alto contenido lipídico, no ejerció dicho efecto estimulador, probablemente porque su elevado contenido en MUFA y el efecto de los compuestos minoritarios podrían haber contrarrestado de alguna forma el efecto perjudicial de las dietas ricas en grasas sobre la modulación de las XMEs.

D. PARAMETROS DE LA CARCINOGENESIS.

Los resultados obtenidos sobre el metabolismo del DMBA, la detección de metabolitos en plasma, así como los niveles de daño genómico en la glándula mamaria en la serie experimental 2, estarían en concordancia con los resultados que se obtuvieron en el análisis de la carcinogénesis tanto en la serie 1 como en la 2.

A pesar de la diferencia de dosis de DMBA administrado en las dos series experimentales, que fue de 5 mg/animal en la serie 1 y 10 mg/animal en la 2, los resultados de ambas series fueron similares y reproducibles, con la única diferencia del tiempo de aparición de los tumores. Así, en la serie experimental 2 el tiempo de latencia fue menor y, en general, todos los parámetros de la carcinogénesis estuvieron acelerados en comparación con la serie experimental 1. Estos resultados estarían en consonancia con lo anteriormente descrito para este modelo experimental, de manera que la dosis de carcinógeno puede variar la eficacia y la velocidad de aparición de tumores ([1299], [2952], [3122]). Además, la dosis es un factor importante en determinados estudios para poder observar o no ciertos procesos durante la carcinogénesis. Debido al interés de obtener una situación de respuesta aguda al DMBA y poder estudiar apropiadamente su metabolización por parte de las XMEs, en la serie experimental 2 se consideró necesario realizar una administración de DMBA a una dosis superior. El aumento de la dosis de carcinógeno no modificó la respuesta final de la carcinogénesis pero permitió estudiar apropiadamente el efecto de la dieta durante la iniciación de la carcinogénesis mamaria ante una exposición aguda al DMBA.

El tipo de patología que desarrollaron los animales de ambas series experimentales fueron afecciones mamarias y en su mayoría tumores malignos, en concreto adenocarcinomas. Este resultado estuvo de acuerdo con lo esperado en este modelo experimental ([1438]). Las patologías benignas más frecuentes en la serie experimental 1 fueron fibroadenomas, seguido de adenomas y fibromas. En la serie experimental 2, posiblemente debido a que fue de menor duración y mayor dosis de DMBA, el número de patologías benignas fue menor y en su mayoría fueron fibroadenomas. En ambas series experimentales, el mayor número de adenocarcinomas se encontró en los grupos de animales alimentados con la dieta rica en PUFA n-6. El rendimiento de la carcinogénesis fue menor en los grupos de dieta control, mientras que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra generó una situación intermedia entre los otros dos grupos experimentales. A pesar de que el número de tumores fue superior en los

grupos alimentados con dieta de aceite de oliva, con respecto al grupo control, estudios previos del grupo de investigación han demostrado que estos tumores presentan unas características histopatológicas similares a las del grupo control, mientras que los tumores de los grupos de dieta de aceite de maíz presentan una clasificación histopatológica propia de un mayor grado de malignidad ([4264]).

Dentro de los parámetros clínicos estudiados, las tres estrategias utilizadas para analizar el **tiempo de latencia** mostraron resultados concordantes entre sí. En la serie experimental 1, el tiempo de aparición del primer tumor, el tiempo medio de latencia y la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria, así como en la serie experimental 2, el tiempo medio de latencia y la distribución por clases, mostraron que la dieta rica en aceite de maíz favoreció la aparición temprana de los adenocarcinomas mamarios, a pesar de que las diferencias observadas entre grupos no fueron estadísticamente significativas. La aparición temprana de la patología mamaria maligna en los grupos alimentados con la dieta rica en PUFA n-6 indicaría una aceleración de la enfermedad cancerosa asociada al consumo de dicha dieta, lo cual es compatible con el efecto estimulador de esta dieta, descrito por el grupo investigador en trabajos previos, así como por otros autores ([1106], [3060], [3615], [4735], [6879]). Este efecto sobre el tiempo de latencia se observó en menor grado en el caso de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra, de manera que los grupos alimentados con dicha dieta mostraron valores intermedios entre los grupos control y los de dieta de aceite de maíz. Por tanto, la dieta de aceite de oliva tendría un efecto menor sobre la aceleración de la aparición de tumores que la dieta rica en aceite de maíz. Por otra parte, cabe mencionar que la falta de significación estadística entre las diferencias observadas en el tiempo de latencia podría ser debida a la gran dispersión de los datos y al tamaño muestral, relativamente bajo. Cabe destacar que los diseños experimentales de ambas series fueron optimizados con el doble objetivo de utilizar el menor número de animales posibles con los que obtener la cantidad necesaria de muestras para los estudios biológicos, así como por razones de practicabilidad.

Los resultados obtenidos en la **incidencia** de afectación mostraron que en todos los grupos de ambas series experimentales, está aumentó a lo largo del estudio mostrando un comportamiento similar, con un crecimiento rápido del número de animales afectados en las primeras etapas y una estabilización en las etapas finales de ambos ensayos. Se observó que el grupo alimentado con dieta hiperlipídica de maíz presentó en ambas series experimentales una

incidencia mayor, y estadísticamente significativa, en comparación con los otros dos grupos lo largo de todo el ensayo. Sin embargo, la incidencia de los grupos de aceite de oliva virgen extra y control presentaron valores próximos entre sí durante todo el estudio en ambas series. Estas diferencias no fueron significativas en el caso de la serie experimental 1, mientras que sí que lo fueron en la serie experimental 2. En el momento final del estudio, el porcentaje de animales afectados en la serie experimental 1 fue del 100% en el grupo ${}_1M_i$, el 75% para el ${}_1O_i$ y el 80% para el ${}_1C_i$. Estos porcentajes fueron superiores en la serie experimental 2, siendo del 100% los animales afectados en los grupos ${}_2M_i$ y ${}_2O_i$, y del 90% en el grupo ${}_2C_i$. Este aumento del número de animales afectados en la serie 2 podría estar relacionado con la mayor dosis de carcinógeno utilizada, que además de acelerar el proceso carcinogénico podría llegar a sobrepasar el efecto beneficioso de ciertas dietas a partir de ciertos momentos del desarrollo de la enfermedad. Además hay que tener en cuenta que el tamaño muestral fue inferior en la segunda serie experimental ($n=10/\text{grupo}$) comparado con el de la serie experimental 1 ($n=20/\text{grupo}$), lo que podría aumentar la variabilidad y disminuir las significaciones estadísticas. Sin embargo, de forma general y teniendo en cuenta los valores de ambas series a lo largo de todo el estudio, se podría afirmar que la dieta rica en PUFA n-6 aumentaría la incidencia de animales afectados, lo cual junto con el menor tiempo de latencia indicarían el efecto estimulador de esta dieta. En cambio, la dieta rica en MUFA n-9, además de en compuestos bioactivos, presentó una incidencia próxima a la del grupo de dieta normolipídica.

El **contenido tumoral** se estudió a través del contenido medio por animal afectado y del número total de tumores por grupo, para poder dar una idea integral del parámetro debido a que cada uno de ellos proporciona una información parcial. En el primer caso, el parámetro presenta el inconveniente de verse afectado por la dinámica de aparición de tumores en animales no afectados anteriormente, mientras que en el caso del contenido tumoral total, podrían presentar el mismo valor grupos con distinta incidencia de afectación. Ambos parámetros aumentaron a lo largo de todo el estudio en los tres grupos experimentales de cada serie. Este aumento fue mayor en el caso de los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz en ambas series experimentales, mientras que los grupos de animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva virgen extra presentaron unos valores intermedios entre los grupos de dieta de aceite de maíz y la control, siendo este último grupo el que obtuvo los valores más bajos para ambos parámetros en las dos series experimentales. Asimismo, no se observó una saturación de estos parámetros hacia el final del estudio en ninguna de las dos series, lo que sugiere una apropiada combinación entre las dosis de DMBA utilizadas y la duración del

ensayo, de manera que no se alcanzó el máximo de posibilidades en cuanto al contenido tumoral. En estudios previos del grupo de investigación con dosis de 20 mg DMBA/animal sí que se observaron situaciones de saturación ([2567]). Los resultados de este tercer parámetro estarían en concordancia con los de incidencia y tiempo de latencia lo que reforzaría el ya descrito efecto estimulador de la dieta rica en PUFA n-6 durante la carcinogénesis mamaria experimental ([3615], [3977], [5321]), observado tanto en resultados del grupo investigador como por otros autores. En cambio, las dietas ricas en MUFA n-9, ejercerían un efecto intermedio o próximo al observado en los grupos de dieta control, a pesar de su alto contenido en lípidos.

El **volumen tumoral** se estudió mediante la utilización de tres parámetros: el volumen total por grupo (V), el volumen medio por animal del grupo (V_A) y el volumen medio por tumor del grupo (V_K). Todos ellos son parámetros distintos conceptualmente y se requiere de los tres para obtener una información completa del volumen tumoral. El volumen tumoral por animal sería más apropiado para establecer comparaciones entre los resultados obtenidos de los tumores experimentales y los humanos dado que en los animales existen seis pares de glándulas mamarias a diferencia de la glándula única de los humanos. El volumen por tumor permitiría comparar dentro del propio modelo experimental. Finalmente, el volumen tumoral total no tendría ningún significado práctico ni intuitivo pero complementaría la información proporcionada por los otros dos parámetros. Además, este último, al no estar influenciado por la incidencia de afectación, no presenta sus problemas.

Tal como sucedió con los otros parámetros, en general el volumen tumoral aumentó a lo largo del estudio en ambas series experimentales. Al estudiar el volumen tumoral total, se observó que en ambas series experimentales los animales de los grupos control presentaron valores inferiores de volúmenes a los otros dos grupos, mientras que en los grupos de las dietas hiperlipídicas los tumores parecieron ser de mayor tamaño. Al analizar el volumen tumoral con respecto al número de animales afectados, se pudo observar que los grupos en los que la incidencia fue mayor, aquellos alimentados con la dieta rica en aceite de maíz, este parámetro puede verse disminuido con respecto al valor de los otros grupos experimentales. Del mismo modo, cuando el número de tumores también es superior en uno de los grupos con respecto a los otros, posiblemente debido a la aparición de nuevos tumores de pequeño tamaño, los valores de volumen medio por tumor también podrían verse disminuidos, como sucedió nuevamente en ambas series experimentales con respecto a la dieta rica en aceite de

maíz. A pesar de que los valores de volumen de los grupos de dietas ricas en aceite de oliva virgen extra presentaron valores superiores a los del grupo control, e incluso en algunos casos superiores a los del grupo de aceite de maíz, los estudios anatomopatológicos realizados por este grupo de investigación en estudios previos demostraron la menor malignidad de los tumores mamarios de los animales de la dieta de aceite de oliva comparado con los tumores de los animales alimentados con dietas de aceite de maíz. Además, estas características anatomopatológicas fueron similares a las de los tumores de los grupos control ([4264]).

En resumen, los parámetros clínicos de la carcinogénesis estudiados en ambas series experimentales demostraron un efecto estimulador de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, mientras que en el caso de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra los resultados no fueron tan claros, presentando una situación intermedia entre las dietas de aceite de maíz y la dieta control. A pesar de las diferencias entre las dos series experimentales en cuanto a la dosis de DMBA, que en general aceleró el proceso carcinogénico en la serie 2, el hecho de que los perfiles de actuación de las diferentes dietas experimentales se mantuvieran similares en ambas series confirmaría estos resultados. Tal como ya se ha mencionado, el efecto estimulador de las dietas ricas en PUFA n-6 sobre la carcinogénesis ya ha sido ampliamente descrito ([1358], [3568], [3672], [4324]). En cambio, existen resultados contradictorios sobre el efecto del aceite de oliva en el cáncer, habiéndose descrito desde un efecto protector ([4303], [4736], [5321]), hasta uno débilmente promotor o una falta de efecto ([3338], [3840], [3861], [4300], [6713]).

En general, los resultados de la carcinogénesis estarían de acuerdo con los resultados moleculares de este trabajo, según los cuales tanto la actividad de las XMEs en hígado, los niveles de DMBA y de sus metabolitos en plasma, así como el daño genotóxico en la glándula mamaria, han demostrado una situación a favor de la iniciación de la carcinogénesis mamaria en el caso de la dieta rica en aceite de maíz, mientras que la dieta de aceite de oliva presentó una situación intermedia entre la anterior y la dieta control. El mayor daño en el ADN de la glándula mamaria debido a la dieta rica en PUFA n-6 estaría en concordancia con los resultados de los parámetros de la carcinogénesis descritos en este apartado, indicando un claro efecto estimulador por parte de dicha dieta sobre la iniciación de la carcinogénesis mamaria a través de su influencia sobre el metabolismo de xenobióticos.

E. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL.

Teniendo en cuenta que el peso corporal es un buen reflejo del desarrollo de los animales, los resultados del estudio de la evolución ponderal mostraron la idoneidad de las tres dietas experimentales para producir el crecimiento normal de las ratas del ensayo. Dicho crecimiento fue homogéneo en todos los grupos experimentales en ambas series, como refleja la pequeña magnitud de las diferencias observadas a lo largo del tiempo y el paralelismo de las curvas de evolución ponderal. Además, los coeficientes de variación fueron uniformemente bajos, indicando que no existían diferencias individuales entre los pesos de los animales de un mismo grupo. El estudio del crecimiento de los animales se completó con la determinación del Índice de Masa Corporal (IMC) y el índice de Lee, éste último específico del grado de adiposidad en rata ([839]). En el caso de la serie experimental 1, los valores del IMC fueron aumentando uniformemente con la edad en todos los grupos, mientras que el Índice de Lee no varió significativamente a lo largo del tiempo, probablemente debido a las características de la ecuación para su cálculo, en la cual la importancia del parámetro que más varía, el peso corporal, es menor. En la serie experimental 2, al medirse semanalmente la longitud naso-anal de cada animal se pudo determinar la evolución de ambos índices a lo largo de todo el estudio y no sólo en el momento de los sacrificios como en la serie 1. Los resultados mostraron que en el caso del IMC se produjo un aumento paulatino en todos los grupos, más rápido en las primeras edades del animal. En el caso del Índice de Lee, se produjo un descenso desde los 24 d.e., inicio del estudio, hasta los 40 d.e. aproximadamente, momento en el que los valores para todos los grupos parecieron estabilizarse, especialmente en los animales sanos.

Por otra parte, cabe destacar que la ausencia de patologías significativas halladas en las exploraciones realizadas sistemáticamente a lo largo del ensayo permitió descartar que se produjeran alteraciones por desequilibrios nutricionales ([827], [905], [5742]). Por tanto, las diferencias que pudieran observarse en todos los parámetros analizados en este trabajo podrían ser atribuidas a cambios producidos por la variable dieta, y no a factores inespecíficos resultantes de dichos desequilibrios.

Por tanto, los resultados obtenidos del correcto crecimiento de los individuos junto con la ausencia de patologías reflejaron la idoneidad de las dietas para realizar el estudio, de manera que ni la dieta ni otros factores experimentales ejercieron un efecto inespecífico sobre

los resultados, ni selectivo sobre los individuos. En caso contrario, los animales se hubieran adaptado, aumentando así la variabilidad de las respuestas individuales.

Un segundo aspecto a considerar es el posible efecto diferencial de los dos tipos de dieta hiperlipídica sobre el peso y la masa corporal. En este sentido, los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz (M20) mostraron un aumento significativo del peso corporal, en ambas series experimentales, así como del IMC e Índice de Lee al final de la serie experimental 1, y del IMC en animales sanos en la serie experimental 2. En este caso, el grupo alimentado con dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra (mO20) presentó unos valores similares al grupo control en dichos parámetros. Otros autores también han descrito un efecto diferencial del tipo de grasa de la dieta sobre el peso corporal. Así, estudios en modelos en rata han descrito un aumento del peso por efecto de una dieta hiperlipídica de PUFA n-6 en comparación con una dieta control ([945], [5423]). En cuanto al efecto de las dietas hiperlipídicas de aceite de oliva, existen pocos datos en la literatura. En ratas ha sido descrito que la administración de una dieta rica en aceite de oliva virgen extra durante 28 días produce una disminución del peso corporal en comparación con una dieta hiperlipídica de aceite de maíz ([6827]). Por otro lado, estudios epidemiológicos que han analizado los efectos beneficiosos de una dieta con un contenido relativamente elevado de aceite de oliva concluyen que dicha dieta no provoca un aumento del peso corporal ([7493]). Además, en otros estudios en humanos se ha relacionado el consumo durante 4 semanas de una dieta hiperlipídica de ácidos grasos saturados (40% de la energía total) con un aumento del peso corporal, mientras que una dieta hiperlipídica basada en aceite de oliva se ha asociado con una disminución de dicho peso ([7482]). Esta disminución también ha sido descrita en otros estudios al comparar el efecto de distintos tipos de dieta hiperlipídica a lo largo de dos años ([7494]). Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con los diversos datos de la literatura, ponen en evidencia que, además de la cantidad total de grasa ingerida, existe un aspecto cualitativo relacionado con el tipo de lípido consumido en el control y mantenimiento del peso corporal.

F. BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS.

Los lípidos de la dieta constituyen los nutrientes que se han relacionado más directamente con el cáncer de mama. Sus efectos moduladores no sólo dependen de la cantidad sino también del tipo de grasas y del periodo de su administración. Las dietas ricas en PUFA n-6, como las basadas en aceites de semillas como el aceite de maíz, ejercen un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria. El papel de las dietas ricas en MUFA n-9, como el aceite de oliva virgen, que además contienen multitud de compuestos minoritarios, es más controvertido. A pesar de que existen muchas evidencias epidemiológicas y experimentales de su potencial efecto protector y quimipreventivo, existen también resultados discordantes en la literatura, habiéndose descrito desde falta de efecto hasta un efecto débilmente estimulador. En cualquier caso, los efectos moduladores de los lípidos de la dieta se ejercerían fundamentalmente durante la promoción de la carcinogénesis. Sin embargo, también se ha sugerido su posible papel durante la iniciación. En trabajos previos del grupo investigador desarrollados en series experimentales anteriores se había constatado un efecto diferencial de las dietas según si su administración se producía desde antes de la inducción con el DMBA, justo después del destete, o a partir de ésta. Así, se constató que la dieta rica en aceite de maíz administrada desde etapas previas a la inducción con el carcinógeno influía en la carcinogénesis mamaria, asociándose a un consistente aumento de la incidencia de animales afectados, aunque con un menor desarrollo posterior de los tumores y un menor grado histopatológico de malignidad en comparación a la situación en la que la dieta se administraba después de la inducción con el DMBA ([3672], [3947], [3975], [4393]). Las diferencias entre ambas situaciones podrían haber sido debidas al diferente estado de diferenciación de la glándula mamaria, que se ha postulado como un factor clave en la resistencia de este tejido a la transformación neoplásica ([3165]). Así, trabajos previos realizados en la serie experimental 1 ya demostraron un adelantamiento de la pubertad debido a dichas dietas en comparación con la dieta control normolipídica, siendo el efecto más importante para la dieta de aceite de maíz. Además, dicha dieta se asoció con una mayor formación de estructuras indiferenciadas o TEBs en la glándula mamaria ([6887]). En humanos, el avance de la pubertad y la menarquia precoz están considerados factores de riesgo de cáncer de mama, ya que la exposición a estrógenos a lo largo de la vida así como el número de ciclos menstruales en los cuales la glándula mamaria sufre un proceso cíclico de crecimiento e involución aumentarían. Como consecuencia, la probabilidad de aparición y acúmulo de mutaciones

espontáneas aumentaría y generaría una mayor susceptibilidad de la glándula a la transformación neoplásica ([5975]). En el presente trabajo se han obtenido nuevos resultados que apoyan la hipótesis de que los efectos diferenciales de los lípidos de la dieta durante la carcinogénesis mamaria experimental se efectúan mediante diversos y complejos mecanismos que no sólo implican la promoción sino también la iniciación del proceso carcinogénico. En concreto, actuando sobre el metabolismo de xenobióticos, facilitando o dificultando la acción del carcinógeno.

En primer lugar, y en relación al análisis de la evolución ponderal y la masa corporal, cabe destacar que la reproducibilidad de los resultados entre las dos series del estudio y con series anteriormente desarrolladas en el laboratorio demuestra la idoneidad de las dietas experimentales utilizadas y pone en evidencia que en el control y el mantenimiento del peso corporal no sólo interviene la cantidad de grasa consumida sino también el tipo. En este sentido, la dieta rica en aceite de maíz aumentó el peso corporal y el grado de adiposidad de los animales a lo largo de todo el estudio, mientras que la dieta rica en aceite de oliva presentó pesos similares a los del grupo control. Resultados previos demostraron que ambas dietas tienen un efecto diferencial sobre el destino metabólico de las grasas. En el caso de la dieta de aceite de oliva, dicho efecto diferencial probablemente esté mediado, al menos en parte, por la oleiletanolamida, un metabolito del ácido oleico, y su diana molecular UCP-2 ([7495], [7177]). Dado que el aumento de adiposidad y la propia obesidad se consideraran un factor de riesgo en cáncer de mama en la población humana ([6093]), el hecho de que la dieta de aceite de maíz aumente el peso corporal en comparación con la dieta de aceite de oliva y la control, supondría un riesgo incrementado frente al cáncer. Entre otros motivos cabría destacar el hecho de que el tejido adiposo es un lugar de bioacumulación de compuestos potencialmente peligrosos ([8151]). Por otra parte, también cabe destacar que los resultados de la serie experimental 2 han puesto de manifiesto que en los grupos de animales inducidos con el carcinógeno, con cáncer, las diferencias de pesos debidas a las dietas son inferiores a las observadas en los grupos de animales sanos, no inducidos, efecto ya descrito por el grupo ([4737]). Esta disminución del peso esta relacionada con la demanda energética aumentada propia del desarrollo de la carcinogénesis y es bien conocido que en determinadas situaciones puede incluso llevar a la caquexia ([7789]).

En segundo lugar, los resultados del estudio de la ontogenia de las XMEs, tanto en hígado como en glándula mamaria, permiten hipotetizar una posible ampliación de la ventana

de susceptibilidad de dicha glándula a la transformación neoplásica por efecto de las dietas hiperlipídicas, especialmente la de aceite de maíz. Dicha dieta influyó sobre las XMEs de manera que en hígado aumentó la expresión de las enzimas de fase I y/o disminuyó las de fase II, y en glándula mamaria, en edades alrededor del inicio de la pubertad, también produjo un aumento de la ratio fase I/fase II. Este aumento de expresión de las XMEs de fase I implicaría una activación más rápida de compuestos xenobióticos hacia compuestos carcinogénicos en edades tempranas, cercanas al inicio de la pubertad. Todo ello apoyaría una situación de mayor susceptibilidad de la glándula mamaria a la iniciación de la carcinogénesis por efecto de la dieta rica en PUFA n-6. Por tanto, el consumo de este tipo de dieta se asociaría a un adelantamiento o un aumento de la ventana de susceptibilidad de la glándula mamaria al cáncer debido tanto al avance de la pubertad que producen como al aumento de expresión de las XMEs de fase I.

Con el objetivo de profundizar en los efectos de los lípidos de la dieta en la iniciación de la carcinogénesis mamaria experimental a través de sus acciones sobre el metabolismo del carcinógeno, se analizó la expresión y actividad hepáticas de las XMEs en las horas previas y, sobre todo, en las inmediatamente posteriores a la administración del carcinógeno, analizando además los niveles de DMBA y de metabolitos activos en plasma, y el daño en el ADN de la glándula mamaria, el tejido diana del carcinógeno. A pesar de la complejidad y las limitaciones de este tipo de estudios *in vivo*, en modelos animales, se han podido dilucidar algunos mecanismos y generar nuevas hipótesis que deberán ser validadas y ampliadas en el futuro con un mayor número de muestras. La importancia del hígado en el metabolismo de xenobióticos por ser el principal órgano metabolizador ya ha sido destacada por diversos autores ([8054], [8055]). Los resultados han sugerido que la capacidad metabolizadora de este tejido es uno de los principales factores responsables de la formación de metabolitos activos del DMBA, que llegarían a la glándula mamaria a través del torrente sanguíneo y actuarían generando daño genotóxico en este tejido. Además, la regulación transcripcional y post-transcripcional de las XMEs, así como las modificaciones post-traduccionales, serían responsables de que la rápida respuesta de este tejido, que se produce fisiológicamente tras la exposición a xenobióticos, sea más o menos equilibrada y/o coordinada entre las fase I y II (Figura 74). Dentro de este proceso, la dieta rica en PUFA n-6 causaría un aumento de la expresión del ARNm de los CYP1s de forma constitutiva en las edades previas a la administración del DMBA (Figura 74.1.), generando unos niveles de ARNm, posiblemente estabilizados, responsables de una mayor respuesta de estas enzimas tras la exposición a

xenobióticos, en comparación con las otras dos dietas (Figura 74.3). Además, esta mayor actividad EROD se produciría de forma descoordinada con respecto a la respuesta de las XMEs de fase II, principalmente de NQO1, cuya actividad estaría disminuida en este grupo experimental (Figura 74.4.). Así, el número de metabolitos activos en plasma sería mayor (Figura 74.5.) y, por lo tanto, también generarían un mayor daño genómico en la glándula mamaria (Figura 74.6.). En cambio, la dieta rica en aceite de oliva y la dieta control normolipídica inducirían una situación más equilibrada, con un metabolismo fase I/fase II mejor coordinado y una menor formación de daño genotóxico en el tejido diana. Aún así, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra ejerció una influencia intermedia entre la dieta de aceite de maíz y la control, que se asociaría a los menores niveles de daño genómico (Figura 74). Estos resultados estarían de acuerdo con los de los parámetros de la carcinogénesis en ambas series experimentales, según los cuales la dieta de aceite de maíz se asoció con mayores valores de incidencia y contenido tumorales, mientras que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra ejercería un leve efecto estimulador de la carcinogénesis (Figura 74. 7.). Sin embargo, cabe destacar que dicha dieta se asoció al menor número de aductos DMBA-ADN a las 12 y 24 horas tras la administración del carcinógeno en comparación con el grupo de aceite de maíz e incluso el control. Es posible que este efecto sea debido a la combinación de su influencia sobre la actividad de las XMEs en hígado y sobre la maduración sexual y la diferenciación de la glándula mamaria. Así, a pesar de que el período de máxima susceptibilidad de la glándula mamaria al desarrollo neoplásico está establecido en este modelo experimental entre los 50 y 55 días de edad, en función del tratamiento dietético, el estado de diferenciación de la glándula y, en consecuencia, el escenario molecular a nivel celular podría ser completamente diferente. Así, mientras en el grupo de aceite de maíz la exposición al DMBA se produciría en una glándula menos diferenciada, lo que generaría mayores niveles de daño en el ADN, debido al mayor número de células proliferativas, en el grupo de aceite de oliva, dicha exposición se produciría sobre una glándula menos proliferativa y, por tanto, más resistente a la transformación. Aún y así, el nivel de daño en el ADN en este grupo también aumentó a partir de las 24 horas post-inducción, lo cual podría explicar la mayor carcinogénesis en relación al grupo control. Asimismo, cabe considerar la diversidad de mecanismos que también operan durante la promoción y la progresión tumoral y que también serían responsables del efecto intermedio, entre el de la dieta de aceite de maíz y el de la dieta control, que ha ejercido la dieta de aceite de oliva en las dos series experimentales de este trabajo. Por otra parte, cabe mencionar que trabajos previos del grupo han demostrado que las dietas ricas en aceite de oliva virgen extra pueden ejercer un efecto

protector de la carcinogénesis mamaria experimental. Esta diversidad de resultados puede ser debida a la diferente composición de los aceites de oliva virgen. Más allá de su elevado contenido en ácido oleico, dicho aceite contiene abundantes compuestos minoritarios bioactivos, que varían su contenido en función de la variedad de aceite, las condiciones de cultivo, la madurez del fruto, etc.

En conclusión, el efecto estimulador de las dietas hiperlipídicas ricas en PUFA n-6 en la carcinogénesis mamaria experimental se ejerce, en parte, durante la etapa de la iniciación, además de sus acciones más conocidas sobre la promoción. Esta acción cocarcinogénica a nivel de iniciación se ejercería, al menos en parte, a través de la modulación del metabolismo de xenobióticos, además de por sus efectos sobre el peso corporal, e grado de adiposidad y la maduración sexual. A través de estos, y posiblemente otros, mecanismos, las dietas ricas en PUFA n-6 aumentarían la susceptibilidad de la glándula mamaria a la transformación neoplásica y, en consecuencia, constituirían un factor de riesgo de cáncer de mama. Por otra parte, el efecto débilmente estimulador de la carcinogénesis mamaria ejercido por la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra se realizó, al menos en parte, a través de una modulación de las XMEs de fase I/fase II intermedia entre la ejercida por las dietas de aceite de maíz y la control. Sin embargo, su efecto sobre el peso corporal y la adiposidad fue más próximo al del grupo control. Además, desde el punto de vista morfológico estos tumores son de menor grado de malignidad que los del grupo de aceite de maíz, siendo más parecidos a los del grupo control. Otros resultados del grupo, así como de otros autores, han reflejado la complejidad de los efectos del aceite de oliva virgen extra, en gran parte debido a su riqueza en compuestos bioactivos. Así, el efecto global de las dietas ricas en dicho aceite es, en general, difícil de dilucidar debido a que su alto contenido en lípidos representa un factor a favor de la carcinogénesis, pero sin embargo otras características, como su particular composición en ácidos grasos y probablemente su riqueza en determinados compuestos bioactivos, serían responsables de los efectos beneficiosos descritos para este aceite. Así, podría postularse el efecto protector de una dieta normolipídica de aceite de oliva virgen extra, a pesar de que en estudios con modelos animales probablemente sería difícil detectar estos efectos beneficiosos de sus componentes a bajas concentraciones.

Finalmente, cabe mencionar que la extrapolación de los resultados obtenidos en trabajos con modelos animales a humanos debe realizarse con precaución. Así, por ejemplo, en el caso de las XMEs y sus factores de transcripción se han descrito diferencias de afinidad

por los sustratos entre diferentes especies ([8204]). Por otra parte, teniendo en cuenta que el efecto de algunos compuestos puede ser totalmente opuesto, quimiopreventivo o estimulador, según las condiciones experimentales, resulta esencial ser cauto a la hora de utilizar la información derivada de la experimentación para recomendar determinados regímenes quimiopreventivos según si se trata de la población general, individuos con un alto riesgo de cáncer, o individuos con la enfermedad. El conjunto de factores de todo tipo a los que se hallan sometidos las personas o exposoma, concepto descrito por primera vez por Wild CP en 2005 ([8026]), entre ellos los xenobióticos y la dieta, es distinto para cada una de ellas y cambiante con el tiempo, por lo que el estudio de las interacciones entre estos factores, y entre estos y los genéticos, resulta de una gran complejidad.

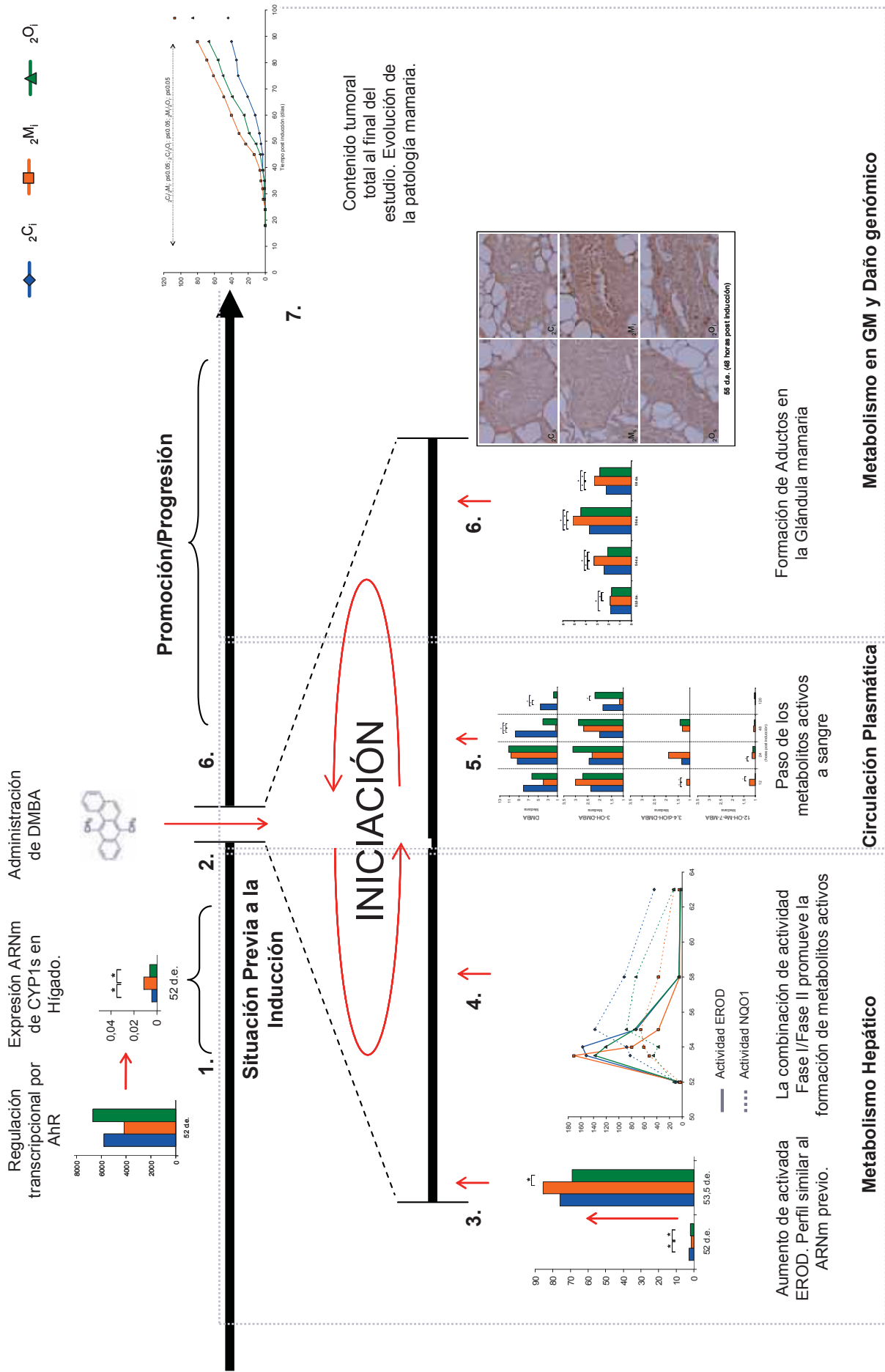


Figura 74. Metabolismo hepático del DMBA responsable de daño genómico en la glándula mamaria durante la iniciación de la carcinogénesis.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. Del estudio de la influencia de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz (rica en PUFA n-6) y de aceite de oliva virgen extra (rica en MUFA n-9 y componentes bioactivos), sobre la expresión tejido específica de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs), así como su expresión a lo largo del tiempo (Ontogenia):

- 1.1 En hígado CYP1A2, GSTP1 y NQO1 presentaron una expresión de ARNm constitutiva, mientras que los niveles de ARNm de CYP1A1 y CYP1B1 fueron muy inferiores. Estos resultados estarían de acuerdo con lo descrito en la literatura. Además, se aportó nueva información sobre la expresión de estas enzimas en la glándula mamaria. CYP1B1 fue la XME de fase I mayoritaria en este tejido, mientras que los niveles de ARNm de CYP1A1 fueron inferiores y CYP1A2 no se detectó. Por su parte, la expresión de GSTP1 fue superior a la de NQO1, presentando ambas enzimas una expresión constitutiva en la glándula mamaria.
- 1.2 La modificación de la expresión de las XMEs a lo largo del tiempo (Ontogenia) en hígado mostró, que en general, todas las enzimas estudiadas presentaron una disminución de la expresión de ARNm con la edad en mayor o menor medida, con la excepción de CYP1A2, que se mantuvo estable. En glándula mamaria, mientras CYP1B1 aumentó sus niveles de ARNm durante las edades alrededor del inicio de la pubertad y la maduración sexual (36-51 días de edad (d.e.)), CYP1A1 presentó un aumento sólo al inicio de la pubertad (36 d.e.) y posteriormente disminuyó. Por su parte las enzimas de fase II en este tejido no mostraron modificaciones a lo largo del tiempo.
- 1.3 El análisis del efecto de la dieta sobre la expresión de estas enzimas a lo largo del tiempo mostró que en hígado la dieta rica en aceite de maíz produjo un aumento de la relación entre la expresión de las enzimas de fase I/fase II con la edad, mientras que la dieta de aceite de oliva virgen extra y la dieta control presentaron unos valores de dicha relación estables en el tiempo. En glándula mamaria, todos los grupos experimentales mostraron un aumento de esta ratio entre los 36 y 51 d.e., siendo mayor y produciéndose antes en el grupo de dieta rica en aceite de maíz.
- 1.4 El efecto de la dieta rica en PUFA n-6 sobre las modificaciones de la ratio de expresión de ARNm de las enzimas de fase I/fase II en hígado y glándula mamaria,

junto con los resultados previos del grupo de investigación sobre el avance de la pubertad en este grupo experimental, relacionarían esta dieta con un adelantamiento y/o un aumento de la susceptibilidad de la glándula mamaria al efecto carcinogénico de compuestos xenobióticos.

2. Del análisis del efecto de los lípidos de la dieta sobre la modulación de la expresión y actividad de las XMEs y su influencia sobre el metabolismo del DMBA, la generación de compuestos reactivos y el daño en la glándula mamaria:

2.1 Los lípidos de la dieta podrían modificar la expresión y actividad basal de los citocromos P450 de la familia 1 (CYP1s), mediante una regulación transcripcional y traduccional. Así, la dieta rica en PUFA n-6, a través de la activación de AhR, probablemente mediada por metabolitos del ácido linoleico, aumentó la expresión de ARNm de los CYP1s en hígado pero no su actividad enzimática, en las edades previas a la administración del DMBA. Por su parte, la dieta rica en aceite de oliva y la dieta control no mostraron dicha activación transcripcional.

2.2 El aumento de la expresión basal de ARNm de CYP1s en hígado por parte de la dieta rica en PUFA n-6 sería responsable de una respuesta enzimática de fase I más rápida que la respuesta fisiológica normal ante la exposición a compuestos xenobióticos. Ello supondría un desfase o una descoordinación con la respuesta enzimática de la fase II durante el metabolismo de estos compuestos, ya que además esta dieta también disminuyó la actividad de NQO1. Por su parte, la dieta rica en aceite de oliva y la dieta control presentaron una actividad, mejor coordinada, de las enzimas de ambas fases tras la inducción con el carcinógeno.

2.3 La dieta rica en PUFA n-6 influyó el metabolismo hepático del DMBA causando una mayor formación de compuestos reactivos, los cuales pasarían al torrente sanguíneo y podrían alcanzar otros tejidos. Así, se ha observado que el número de estos compuestos en plasma fue mayor en el caso de la dieta rica en aceite de maíz en las primeras horas post inducción comparado con los otros dos grupos experimentales. Por su parte, el grupo control presentó los valores más bajos, mientras que en el grupo de dieta rica en aceite de oliva se observó una situación intermedia.

- 2.4 El mayor número de compuestos reactivos producidos durante el metabolismo del DMBA en el grupo de dieta rica en aceite de maíz, se asoció a una mayor formación de daño genómico, en forma de aductos DMBA-ADN, en la glándula mamaria. Por otra parte, en línea con los niveles plasmáticos de metabolitos reactivos detectados, la formación de aductos en el grupo de aceite de oliva fue inferior a la del grupo de aceite de maíz pero mayor que la del grupo control, el cual presentó los menores niveles, especialmente a los 55 y 58 días de edad.

3. De la determinación de los parámetros clínicos de la carcinogénesis y el efecto modulador de los lípidos de la dieta sobre el desarrollo del cáncer:

- 3.1 Los resultados obtenidos en las dos series experimentales corroboraron el claro efecto estimulador de la dieta rica en PUFA n-6 sobre la carcinogénesis mamaria experimental y el débilmente promotor de la dieta hiperlipídica rica en aceite de oliva virgen extra.
- 3.2 Con la información disponible, en este trabajo se describe por primera vez el efecto de los lípidos de la dieta sobre la iniciación del cáncer de mama experimental a través de la modulación del metabolismo de xenobióticos. Los resultados sobre el metabolismo del DMBA, la formación de compuesto reactivos y el daño genómico en la glándula mamaria estuvieron en consonancia con los resultados posteriormente obtenidos en el estudio de los parámetros de la carcinogénesis. Así, los mayores valores de daño en el ADN observados en el grupo de dieta rica en aceite de maíz se correspondieron con los mayores valores de incidencia y contenido tumoral. Por su parte, el grupo de dieta rica en aceite de oliva presentó valores intermedios entre los otros dos tanto de daño genómico en la glándula mamaria como de incidencia y contenido tumorales.

4. Del estudio del efecto de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal y la masa corporal.

- 4.1 Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la evolución del peso corporal de los animales confirmaron que no sólo la cantidad de grasas en la dieta sino también el tipo de lípido consumido son determinantes en el control y mantenimiento del peso corporal. Así, la dieta rica en PUFA n-6 provocó un aumento del peso y la adiposidad,

mientras que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra no tuvo dicho efecto, a pesar de ser también hiperlipídica.

- 4.2 El aumento de la adiposidad por parte de la dieta rica en PUFA n-6 podría potenciar el efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria de esta dieta a través de la bioacumulación de compuestos xenobióticos y su posterior metabolismo, entre otros mecanismos. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva virgen extra al no producir este aumento de la adiposidad, no supondría un riesgo aumentado sobre la acumulación de estos compuestos.

1. From the study on the influence of the high corn oil (rich in PUFA n-6) and high extra virgin olive oil (rich in MUFA n-9 and bioactive compounds) diets, on the specific tissue expression of the xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs), as well as its expression along the time (Ontogeny):

- 1.1 In the liver, CYP1A2, GSTP1 and NQO1 showed a constitutive ARNm expression, while CYP1A1 and CYP1B1 ARNm levels were significantly lower. These results would be in accordance with that described in literature. Furthermore, new data on the expression of these enzymes in the mammary gland was contributed. CYP1B1 was the major phase I XME in this tissue, while CYP1A1 mRNA levels were lower and CYP1A2 was undetectable. On the other hand, GSTP1 expression was higher than that of NQO1, with both enzymes presenting a constitutive expression in the mammary gland.
- 1.2 The changes in XMEs expression over time (Ontogeny) in the liver showed that, in general, all the studied enzymes exhibited a decrease of mRNA expression with age to a greater or lesser extent, with the exception of CYP1A2, which remained stable. In the mammary gland, while CYP1B1 increased its mRNA levels during the ages around puberty onset and sexual maturity (36-51 days of age), CYP1A1 showed an increase only in the beginning of puberty (36 days of age) and decreased after. On the other hand, phase II enzymes in this tissue did not present changes over time.
- 1.3 The analysis of the dietary lipids effect on the enzyme expression of these enzymes along the time showed that, in the liver, the high corn oil diet increased the relation between the phase I/phase II enzymes expression with the age, whereas the high extra virgin olive oil diet and the control diet showed stable values of this relation over time. In the mammary gland, all experimental groups exhibited an increase of this ratio between 36 and 51 days of age, being higher and earlier in the high corn oil diet group.
- 1.4 The effect of the high PUFA n-6 diet on the ratio between the mRNA expression of the phase I and phase II XMEs in the liver and in the mammary gland, along with previous results about the puberty advance in this experimental group, would relate this diet with an advancement and/or an increase of the mammary gland susceptibility to the xenobiotic carcinogenic effect.

2. From the analysis of the dietary lipids effect on the modulation of the XMEs expression and activity and its influence on DMBA metabolism, reactive compounds generation and mammary gland damage:

- 2.1 The dietary lipids could change the basal expression and activity of family 1 P450 cytochromes (CYP1s) by means of a transcriptional and translational regulation. Thus, the high PUFA n-6 diet, through the AhR activation, probably mediated by linoleic acid metabolites, increased CYP1s mRNA expression in the liver but not their enzymatic activities, in the previous ages to DMBA administration. On the other hand, the high olive oil and control diets did not show this transcriptional activation.
- 2.2 The increase of the CYP1s mRNA basal expression in the liver, owing to the high PUFA n-6 diet would be responsible for a faster phase I enzymatic response due to xenobiotic exposure than the physiological one. This would cause a gap or an incoordination with the phase II enzymatic response during the metabolism of these compounds, since this diet also decreased the NQO1 activity. On the other hand, the high olive oil and the control diets showed a better coordinated activity of both enzymatic phases after the carcinogen induction.
- 2.3 The high PUFA n-6 diet influenced DMBA liver metabolism being associated to a higher formation of reactive compounds, which would pass to the blood flow and could reach other tissues. Thus, the plasmatic levels of these compounds was higher in the case of the high corn oil diet in the first hours after induction compared to the other two experimental groups. On the other hand, the control group showed the lowest values, while the high olive oil diet group displayed an intermediate situation.
- 2.4 The higher reactive compounds levels produced during DMBA metabolism due to the high corn oil diet was associated to a the higher genomic damage formation (DMBA-DNA adducts) in the mammary gland. On the other hand, in line with the reactive metabolites levels, the adduct formation was higher in high olive oil diet group was lower than that in the high corn oil group but higher than the control group, which showed the lowest levels, specially at 55 and 58 days of age.

3. From the carcinogenesis clinical parameters determination and the modulating effect of the dietary lipids on cancer development:

- 3.1 The results obtained in the two experimental series corroborated the clear stimulating effect of the high PUFA n-6 diet on the mammary experimental carcinogenesis and the weakly promoter effect of the high extra virgin olive oil diet.
- 3.2 This work describes for the first time, under our knowledge, the dietary lipid effect on the initiation of the experimental breast cancer through the xenobiotic metabolism modulation. The results about the DMBA metabolism formation of reactive compounds formation and mammary gland genomic damage were in accordance with the results later obtained in the carcinogenesis parameters study. Thus, the highest DNA damage levels observed in the high corn oil diet group corresponded with the highest tumour incidence and yield. On the other hand, the high olive oil diet group showed intermediate values between those of the other two experimental groups, both in the mammary gland genomic damage and the tumour incidence and yield.

4. From the study of the dietary lipids effect on the body weight evolution and body mass:

- 4.1 The results of this work about the animals' body weight evolution confirmed that not only the dietary fat amount but also the type of the lipid consumed are determinants in the body weight control and maintenance. Thus, the high PUFA n-6 diet triggered an increase in the animals' body weight and adiposity, while the high extra virgin olive oil diet did not have such effect, although also being hyperlipidic.
- 4.2 The adiposity increase due to the high PUFA n-6 diet could enhance its stimulating effect of the mammary carcinogenesis through the xenobiotic bioaccumulation and its further metabolism, among other mechanisms. On the other hand, the high extra virgin olive oil diet, while not producing this adiposity increase, also would not suppose an increased risk on the accumulation of these compounds.

CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFÍA

NOTA:

El número de las referencias se corresponde con el que posee cada una de ellas en la base de datos donde se encuentran informatizadas.

- [439] HUGGINS C, GRAND LC and BRILLANTES FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature*, 1961, 189:204-07.
- [443] HUGGINS C, MORII S and GRAND LC. Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann. Surg.*, 1961, 154:315-18.
- [446] PECKHAM JC. Experimental oncology. En "The Laboratory Rat. Vol. II, Research Applications", BAKER HJ, LINDSEY JR, WEISBROTH SH, Academic Press, New York, 1980, 119-47.
- [447] ALTMAN NH and GOODMAN DG. Neoplastic diseases. En "The Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Diseases", BAKER HJ, LINDSEY JR, WEISBROTH SH, Academic Press, New York, 1979, 333-76.
- [453] ROSEN JM, RICHARDS DA, GUYETTE W and MATUSIK RJ. Steroid-hormone modulation of prolactin action in the rat mammary gland. En "Gene Regulation by Steroid Hormones", ROY AK and CLARK JH, Springer-Verlag, New York Inc., 1980, 58-77.
- [566] ROWETT HGQ. Guías de Disección. III - La Rata (con notas sobre el ratón), colección Guías Urania, URANIA SA, Barcelona, 1976.
- [576] WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Organization histological typing of breast tumors - second edition. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1982, 78:806-16.
- [583] DELOUIS C. Histopathologie du sein: rôle des hormones dans l'élaboration de la maturation du tissu mammaire. En "Récepteurs hormonaux et pathologie mammaire". MARTIN PM, Medsi, París, 1980, 11-32.
- [586] NETTER FH. Anatomía y patología de la glándula mamaria. En "Sistema reproductor", tomo II, Colección Ciba de ilustraciones médicas, Salvat, 1982, 243-63.
- [798] ESCRICH E. Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamarios experimentales. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA, 1985.
- [824] DESLYPERE JP, VERDONCK and VERMEULEN A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1985, 61:564-70.
- [827] ROGERS AE. Nutrition. En "The Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Diseases". BAKER HJ, LINDSEY JR and WEISBROTH SH. Academic Press, New York, 1979, 123-52.
- [839] IP C, YIP P and BERNARDIS LL. Role of prolactin in the promotion of dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors by dietary fat. *Cancer Res.*, 1980, 40(2):374-78.
- [855] KHON DF and BARTHOLD SW. Biology and diseases of rats. En "Laboratory Animal Medicine", FOX JG, COHEN BJ, LOEW FM, Academic Press, New York Inc., 1984, 91-122.
- [860] ARMSTRONG BK, McMICHAEL AJ and MacLENNAN R. Diet. En "Cancer epidemiology and prevention". SCHOTTENFELD D and FRAUMENI Jr JF. WB Saunders Company, Philadelphia, 1982, 419-32.
- [868] CARROLL KK and KHOR HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 1975, 10:308-53.
- [895] KIMATA K, SAKAKURA T, INAGUMA Y, KATO M and NISHIZUKA. Participation of two different mesenchymes in the developing mouse mammary gland: synthesis of basement membrane components by fat pad precursor cells. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1985, 89:243-57.
- [905] SUBCOMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION, COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, BOARD ON AGRICULTURE AND RENEWABLE RESOURCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of laboratory animals. En "Nutrient Requirements of Domestic Animals", NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Washington, DC, 1978, 6-35.
- [918] WELSCH CW and AYLSWORTH CF. Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding high levels of dietary fat: a hormonal mechanism?. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1983, 70:215-21.
- [920] KRITCHEVSKI D, WEBER MM and KLURFELD DM. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1984, 44:3174-77.
- [921] HILLYARD LA and ABRAHAM S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. *Cancer Res.*, 1979, 39:4430-37.
- [927] AYLSWORTH CF, JONE C, TROSKO JE, MEITES J and WELSCH CW. Promotion of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary tumorigenesis by high dietary fat in the rat: possible role of intercellular communication. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 72:637-45.
- [934] SYLVESTER PW, RUSELL M, IP M and IP C. Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation, and endocrine function in rats. *Cancer Res.*, 1986, 46:757-62.
- [943] KING MM, McCAY PB and RUSSO IH. Dietary fat may influence DMBA-initiated mammary gland carcinogenesis by modification of mammary gland development. En "Diet, Nutrition, and Cancer: From Basic Research to Policy Implications", ALAN R LISS Inc, New York, 1983, 61-90.

- [945] INNAMI S, YANG MG, MICKELSEN O and HAFS HD. The influence of high-fat diets on estrous cycles, sperm production and fertility of rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1973, 143:63-68.
- [976] MARTIN ME, VRANCKX R, BENASSAYAG C and NUNEZ EA. Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261:2954-59.
- [1029] NEMOTO N. Marked activation of benzo(a)pyrene to protein-binding forms in the presence of unsaturated fatty acids and heme-compounds. *Carcinogenesis*, 1986, 7:267-71.
- [1030] HOUEBINE LM. Contrôle hormonal du développement et de l'activité de la glande mammaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1986, 26:523-41.
- [1046] IP C and IP MM. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12- dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 66:291-95.
- [1047] CAVE WT Jr and JURKOWSKI JJ. Dietary lipid effects on the growth membrane composition, and prolactin-binding capacity of rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 73:185-91.
- [1077] COHEN LA. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res.*, 1981, 41:3808-10.
- [1106] COHEN LA, THOMPSON DO, MAEURA Y, CHOI K, BLANK ME and ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer. I- Promoting effects of different dietary fats on N-Nitrosomethylurea- induced rat mammary tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 1:33-42.
- [1107] COHEN LA, THOMPSON DO, CHOI K, KARMALI RA and ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer: II- Modulation of serum and tumor lipid composition and tumor prostaglandins by different dietary fats: association with tumor incidence patterns. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 77:43-51.
- [1141] YOUNG S and HALLOWES RC. Tumours of the mammary gland. En "Pathology of Tumour in Laboratory Animals", Vol. I, Tumours of the rat. Part 1, 1973. TUROSOV, Lyon IARC, 31-74.
- [1299] ESCRICH E. Mammary cancer model induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: a good experimental tool for the study of tumour markers. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2:109-19.
- [1310] ADER R and FRIEDMAN SB. Plasma corticosterone response to environmental stimulation: effects of duration of stimulation and the 24-hour adrenocortical rhythm. *Neuroendocrinol.*, 1968, 3:378-86.
- [1347] GIDWITZ S, PESSIN JE, WEBER MJ, GLASER M and STORM DR. Effect of membrane phospholipid composition changes on adenylate cyclase activity in normal and rous-sarcoma-transformed chicken embryo fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 628:263-76.
- [1355] WELSCH CW. Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 45:S192-S202.
- [1358] IP C. Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 45:S218-S24.
- [1383] SOLOMONSON LP, LIEPKALNS VA and SPECTOR AA. Changes in (Na+K+)-ATPase activity of Ehrlich Ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry*, 1976, 15:892-97.
- [1387] Pathology of Laboratory Animals. Vol. I. K BENIRSCHKE, FM GARNER, TC JONES, Springer-Verlag, 1978.
- [1390] Pathology of Laboratory Animals. Vol. II. K BENIRSCHKE, FM GARNER, TC JONES, Springer-Verlag, 1978.
- [1425] DIPPLE A, MICHEJDA CJ and WEISBURGER EK. Metabolism of chemical carcinogens. En "Mechanism of Cellular Transformation by Carcinogenic Agents", GRUNBERGER D, GOFF S, Pergamon Press, 1987, 1-32.
- [1438] ESCRICH E. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2:197-206.
- [1486] IP C, IP M and SYLVESTER PW. Relevance of trans fatty acids and fish oil in animal tumorigenesis studies. En "Dietary Fat and Cancer", ALAN R LISS Inc, New York, 1986, 283-94.
- [1489] AYLSWORTH CF, WELSCH CW, KABARA JJ and TROSKO JE. Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat. *Lipids*, 1987, 22:445-54.
- [1518] SPECTOR AA and BURNS CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.*, 1987, 47:4529-37.
- [1520] RUSSO J and RUSSO IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 1987, 57:112-37.
- [1560] LOMEIO F, KHOKHER MA and DANDONA P. Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog. Lipid Res.*, 1986, 25:511-13.
- [1576] GELMANN P and LIPPMAN ME. Understanding the role of oncogenes in human breast cancer. En "Growth factors and oncogenes in breast cancer". SLUYSER M, Weinheim-New York, Ellis Horwood series in biomedicine, 1987, 29-43.

- [1660] ARMSTRONG B and DOLL R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer*, 1975, 15:617-31.
- [1666] HILL MJ, GODDARD P and WILLIAMS REO. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet*, 1971, 2:472-73.
- [1678] ESCRICH E. Lípidos de la dieta y cáncer de mama. Tesis doctoral, Barcelona, 1990.
- [1854] FERNANDES G and VENKATRAMAN JT. Modulation of breast cancer growth in nude mice by omega 3 lipids. *World Rev. Nutr. Diet*, 1991, 66:488-503.
- [1881] CANTLEY LC, AUGER KR, CARPENTER C, DUCKWORTH B, GRAZIANI A, KAPELLER R and SOLTOFF S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 1991, 64(2):281-302.
- [1937] RONAI Z, LAU Y and COHEN LA. Dietary n-3 fatty acids do not affect induction of Ha-ras mutations in mammary glands of NMU-treated rats. *Mol. Carcinogen.*, 1991, 4:120-28.
- [1943] WELSCH CW. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.*, 1992, 52(7 Suppl):2040s-48s.
- [1948] VAN DE VIJVER MJ and NUSSE R. The molecular biology of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1072:33-50.
- [1962] FREEDMAN LS, CLIFFORD C and MESSINA M. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. *Cancer Res.*, 1990, 50:5710-19.
- [1975] HUNTER T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 1991, 64:249-70.
- [2045] CARROLL KK. Dietary fat and breast cancer. *Lipids*, 1992, 27:793-97.
- [2050] WEBER PC. n-3 fatty acids and human disease. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1990, 50:14-19.
- [2085] DEVRIES CEE and VANNOORDEN CJF. Effects of dietary fatty acid composition on tumor growth and metastasis. *Anticancer Res.*, 1992, 12:1513-22.
- [2137] SUMIDA C, GRABER R and NUNEZ E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 1993, 48:117-22.
- [2227] HIMENO Y, ENGELMAN RW and GOOD RA. Influence of calorie restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:5497-01.
- [2245] NAKAYAMA M, RAN JU H, SUGANO M, HIROSE N, UEKI T, DOI F and EYNARD AR. Effect of dietary fat and cholesterol on dimethylbenz(α)-anthracene-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Anticancer Res.*, 1993, 13:691-698.
- [2260] HAEFFNER EW. Diacylglycerol: formation and function in phospholipid-mediated signal transduction. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 105C:337-345.
- [2264] CLANDININ MT, CHEEMA S, FIELD CJ, GARG ML, VENKATRAMAN J and CLANDININ TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.*, 1991, 5:2761-68.
- [2265] MIZUKAMI Y, NONOMURA A, NOGUCHI M, TANIYA T, THOMAS MA, NAKAMURA S and MIYAZAKI I. Effects of high and low dietary fat and indomethacin on tumour growth, hormone receptor status and growth factor expression in DMBA-induced rat breast cancer. *Int. J. Tissue React.*, 1992, 14:269-76.
- [2272] TILLOTSON JK, DARZYNKIEWICZ Z, COHEN LA and RONAI Z. Effects of linoleic acid on mammary tumor cell proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int. J. Oncol.*, 1993, 3:81-87.
- [2276] MERRILL AH and SCHROEDER JJ. Lipid modulation of cell function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1993, 13:539-59.
- [2289] ROSE DP, HATALA MA, CONNOLLY JM and RAYBURN J. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res.*, 1993, 53:4686-90.
- [2363] HOWELL A, De FRIEND D and ANDERSON E. Mecanismos de respuesta y resistencia a la terapia endocrina en el cáncer de mama y desarrollo de nuevos tratamientos. En "Revisiones: Cáncer Endocrino-Dependiente", VHT JAMES, The Journal of Endocrinology Ltd., 1993, 43:7-26.
- [2388] SINGER B and KUSMIEREK JT. Chemical mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1982, 52:655-93.
- [2393] RUSSO J, CALAF G, SOHI N, TAHIN Q, ZHANG PL, ALVARADO ME, ESTRADA S and RUSSO IH. Critical steps in breast carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1993, 698:1-20.
- [2406] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hCG and inhibin in breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 1994, 4:297-306.
- [2415] CLARKE SD and JUMP DB. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 1993, 32:139-49.
- [2422] CLARKE SD. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.*, 1994, 14:83-98.

- [2430] GRABER R, SUMIDA CH and NUNEZ EA. Fatty acids and cell signal transduction. *J. Lipid Med. Cell Sign.*, 1994, 9:91-116.
- [2444] BIÈCHE I, CHAMPÈME MH, LIDEREAU R. A tumor suppressor gene on chromosome 1p32-pter controls the amplification of MYC family genes in breast cancer. *Cancer Res.*, 1994, 54(16):4274-76.
- [2493] HARTWELL L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 1992, 71:543-46.
- [2522] MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNET LM and DING W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, 266:66-71.
- [2542] CLARKE SD and ABRAHAM S. Gene expression: nutrient control of pre- and post-transcriptional events. *FASEB J.*, 1992, 6:3146-52.
- [2545] BLAKE WL and CLARKE SD. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J. Nutr.*, 1990, 12:1727-29.
- [2547] JUMP DB, CLARKE SD, MacDOUGALD O and THELEN A. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:8454-58.
- [2549] KIM KH and TAE HJ. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.*, 1994, 124:1273S-83S.
- [2556] DIVECHA N and IRVINE RF. Phospholipid signaling. *Cell*, 1995, 80:269-78.
- [2567] ESCRICH E, SOLANAS M and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I-diet definition. *Int. J. In Vivo Res.*, 1994, 8:1099-106.
- [2568] ESCRICH E, SOLANAS M, RUIZ DE VILLA MC, RIBALTA T, MUNTANE J and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *Int. J. In Vivo Res.*, 1994, 8:1107-12.
- [2571] SEKIMIZU K. Interactions between DNA replication-related proteins and phospholipid vesicles in vitro. *Chem. Phys. Lipids*, 1994, 73:223-30.
- [2572] KINNUNEN PKJ, JUKKA AK, LEHTONEN JYA, RYTOMAA MA and MUSTONEN P. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surface. *Chem. Phys. Lipids*, 1994, 73:181-207.
- [2586] WOOSTER R and STRATTON MR. Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. *Trends Genet.*, 1995, 11:3-5.
- [2606] SAGER R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 1989, 246(4936):1406-12.
- [2612] BURN P. Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 1988, 13:79-83.
- [2613] NIGGLI V and BURGER MM. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Membrane Biol.*, 1987, 100:97-121.
- [2614] GRIMARD R, TANCREDE P and GICQUARD C. Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 190:1017-22.
- [2617] LANDSCHULTZ KT, KAESTNER KH and LANE MD. Regulation of mouse liver stearoyl-CoA desaturase gene expression by dietary carbohydrate and fat. *FASEB J.*, 1991, 5:A1649.
- [2629] HALL M and GROVER PL. Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumor initiation. *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I. Handbook of Experimental Pharmacology. Volume 94/1*, 1990, 327-372.
- [2631] BIRKENFELD A and KASE NG. Functional anatomy and physiology of the female breast. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 1994, 21:433-44.
- [2632] KELLER-WOOD M and BLAND KI. Breast physiology in normal, lactating and diseased states. En "The Breast. Comprehensive Managements of Benign and Malignant Diseases". BLAND KI and COPELAND EM, 1991, 36-40.
- [2633] IMAGAWA W, YANG J, GUZMAN R and NANDI S. Control of mammary gland development. En "The Physiology of Reproduction", E KNOBIL, JD NEIL, Raven Press, Ltd., New York, 1994, 1033-63.
- [2636] YEN SSC. Prolactina en la reproducción humana. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 382-413.
- [2637] CATT KJ and DUFAU ML. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acciones. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 126-77.
- [2638] YEN SCC. Ciclo menstrual humano: regulación neuroendocrina. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 296-332.

- [2639] SANTEN RJ. Hipogonadismo humano. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 765-820.
- [2789] EXTON JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.*, 1994, 56:349-69.
- [2845] GAYTHER SA, WARREN W, MAZOYER S, RUSSELL PA, HARRINGTON PA, CHIANO M, SEAL S, HAMOUDI R, VAN RENSBURG EJ, DUNNING AM, LOVE R, EVANS G, EASTON D, CLAYTON D, STRATTON MR and PONDER BA. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat. Genet.*, 1995, 11:428-33.
- [2846] COX LA, CHEN G and LEE EY-HP. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. *Breast Cancer Res. Tr.*, 1994, 32:19-38.
- [2949] IP C, BRIGGS SP, HAEGELE AD, THOMPSON HJ, STORKSON J and SCIMECA JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, 1996, 17:1045-50.
- [2952] RUSSO J and RUSSO IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1996, 39:7-20.
- [2955] SINGH J, HAMID R and REDDY BS. Dietary fat and colon cancer: modulating effect of types and amount of dietary fat on ras-p21 function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res.*, 1997, 57:253-58.
- [2984] DAVIS CD and SNYDERWINE EG. Analysis of EGFR, TGF- α , neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis*, 1995, 16:3087-92.
- [3012] RONAI Z, TILLOTSON J and COHEN L. Effect of dietary fatty acids on gene expression in breast cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995, 375:85-95.
- [3060] SUNDRAM K, KHOR HT, ONG A and PATHMANATHAN R. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-Dimethylbenz(α)anthracene. *Cancer Res.*, 1989, 49:1447-51.
- [3114] ROSE DP. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am. J. Nutr.*, 1997, 66:1513S-22S.
- [3122] RUSSO IH and RUSSO J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *J. Natl. Inst. Env. Health Sci.*, 1996, 9:938-67.
- [3123] REID SE, MURTHY MS, KAUFMAN M and SCANLON EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br. J. Surg.*, 1996, 83:1037-1046.
- [3144] HARRIS, CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Environ Health Prospect.*, 1996, 104:435-39.
- [3165] RUSSO J and RUSSO IH. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)*, 1997, 57:S81-S91.
- [3185] CAVE WT Jr. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatm.*, 1997, 46:239-46.
- [3195] THOMPSON H, ZHU Z, BANNI S, DARCY K, LOFTUS T and IP C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implications for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.*, 1997, 57:5067-72.
- [3205] IP C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 66:S1523S-S95.
- [3229] VISIOLI F and GALLI C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agricult. Food Chem.*, 1998, 10:4292-96.
- [3321] WREN BG. Do progestagens reduce the risk of breast cancer? A review of the evidence. *Menopause*, 1996, 3:4-12.
- [3326] IBRAHIM NK and HORTOBAGYI GN. New antiestrogens in breast cancer: a review. *Breast J.*, 1998, 4:213-29.
- [3332] GRAHAM JD and CLARKE CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.*, 1997, 18:502-19.
- [3334] ROSEN JM, HUMPHREYS R, KRNACIK S, JUO P and RAUGHT B. The regulation of mammary gland development by hormones, growth factors, and oncogenes. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1994, 387:95-111.
- [3338] FAY MP, FREEDMAN LS, CLIFFORD CK and MIDTHUNE DN. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.*, 1997, 57(18):3979-88.
- [3339] WATSON WH, CAI J and JONES DP. Diet and apoptosis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20: 485-505.
- [3355] DAVIDSON LA, LUPTON JR, JIANG JH and CHAPKINS RS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis*, 1999, 5:785-91.
- [3370] SRIVASTAVA P, RUSSO J, MGBONYEBI OP and RUSSO IH. Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells. *Anticancer Res.*, 1998, 18:4003-10.

- [3372] BENAUD C, DICKSON RB and THOMPSON EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, 50:97-116.
- [3405] IWASE H, OMOTO Y, IWATA H, HARA Y, ANDO Y and KOBAYASHI S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology*, 1998, 55:S11-S16.
- [3412] BORRÁS JM, BORRÁS J, VILADIU P and BOSCH FX. Epidemiologia i prevenció del càncer a Catalunya (1975-1992). Institut Català d'oncologia, 1ª edició, 1997.
- [3421] WYNDER EL, COHEN LA, MUSCAT JE, WINTERS B, DWYER JT and BLACKBURN G. Breast cancer: weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, 89:766-75.
- [3503] RUSSO H, GUSTERSON BA, ROGERS AE, RUSSO IH, WELLINGS SR and ZWIETEN J. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Investing.*, 1990, 3:244-78.
- [3535] VACARESSE N, LAJOIE-MAZENC I, AUGE N, SUC I, FRISACH MF, SALVAYRE R and NEGRE-SALVAYRE A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ. Res.*, 1999, 85:892-99.
- [3562] WILLWTT WC. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. *Semin. Cancer Biol.*, 1998, 8(4):245-53.
- [3567] BANNI S, ANGIONI E, CASU V, MELIS MP, CARTA G, CORONGIU FP, THOMPSON H and IP C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*, 1999, 6:1019-24.
- [3568] BARTSCH H, NAIR J and OWEN RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999, 20:2209-2218.
- [3569] ROSE DP and CONNOLLY JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.*, 1990, 50:7139-44.
- [3573] WEISBURGER JH. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1997,97:S16-S23.
- [3581] SNYDERWINE EG and DAVIS CD. Proliferation, development and DNA adduct levels in the mammary gland of rats given 2-amino-1-methyl-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine and a high-fat diet. *Carcinogenesis*, 1998, 19:1209-15.
- [3588] HILAKIVI-CLARKE L, STOICA A, RAYGADA M and MARTIN MB. Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring. *Cancer Res.*, 1998, 58(4):654-60.
- [3615] WOUTERSEN RA, APPEL MJ, GARDEREN-HOETMER A and VW WIJNANDS M. Dietary fat and carcinogenesis. *Mut. Res.*, 1999, 443:111-27.
- [3616] HAMID R and SING J. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and 2 in NMU-induced rat mammary tumors. *Intl. J. Oncol.*, 1999, 14:523-28.
- [3619] RAO C, NEWMARK H and REDDY B. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 1998, 2:287-90.
- [3620] TJ SMITH, GY YANG, DN SERIL, J LIAO, and S KIM. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 703-06.
- [3672] SOLANAS M, MORAL R, COLOMER R and ESCRICH E. Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J. Women's Cancer*, 2000, 2:67-72.
- [3673] KRITCHEVSKY D. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Toxicol. Sciences*, 1999, 52:13-16.
- [3695] DANIEL LW, SCIORRA VA and GHOSH S. Phospholipase D, tumor promoters, proliferation and prostaglandins. *Bioch. Biophys. Acta*, 1999, 1439:265-76.
- [3701] UCHIDA N, OKAMURA S-I, NAGAMAGHI Y and YAMASHITA S. Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997, 123:280-85.
- [3771] NEWMARK HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999, 889:193-203.
- [3824] GLASGOW WC, HUI R, EVERHART AL, JAYAWICKREME SP, ANGERMAN-STEWART J, HAN BB and ELING TE. The linoleic acid metabolite, (13S)-hydroperoxyoctadecadienoic acid, augments the epidermal growth factor signalling pathway by attenuation of receptor dephosphorylation. Differential response in Syrian hamster embryo tumor suppressor phenotypes. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:19269-19276.
- [3840] LEE MM and LIN SS. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:221-48.
- [3844] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.*, 2000, 83:S59-S66.

- [3852] COHEN LA, EPSTEIN M, PITTMAN B and RIVENSON A. The influence of different varieties of olive oil on N-methylnitrosourea(NMU)-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.*, 2000, 20:2307-12.
- [3854] OWEN RW, MIER W, GIACOSA A, HULL WE, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38:647-59.
- [3857] KACHHAP SK, DANGE P and NATH GHOSH S. Effect of ω -6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Let.*, 2000, 154:115-20.
- [3861] LA VECCHIA C, NEGRI E, FRANCESCHI S, DECARLI A, GIACOSA A and LIPWORTH L. Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy). *Cancer Causes Control*, 1995, 6:545-50.
- [3864] MARTIN-MORENO JM. The role of olive oil in lowering cancer risk: Is this real gold or simply pinchbeck?. *J. Epidemiol. Commun. Health*, 2000, 54(10): 726-27.
- [3923] WEISS L and GREEP RD. La glándula mamaria. En "Histología". Ed. "El Ateneo", Barcelona, 1982, 4ª ed., 822-45.
- [3924] ROSEN PP and OBERMAN HA. Anatomy. En "Tumors of the mammary gland". ROSAI J and SOBIN LH, AFIP, Washington DC, 1992, 11-13.
- [3929] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 2001, 131:1129-32.
- [3947] ESCRICH E, SOLANAS M, SOLER M, RUIZ DE VILLA MC, SÁNCHEZ JA and SEGURA R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.*, 2001, 12:536-49.
- [3973] HANAHAN D and WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100:57-70.
- [3975] SOLANAS M, MORAL M, ESCRICH E. The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in c-Ha-ras1 mRNA expression. *Nutr. Res.*, 2001, 21:1261-73.
- [3977] KARMALI RA, DONNER A, GOBEL S and SHIMAMURA T. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on 7,12 dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.*, 1989, 9:1161-67.
- [3980] BÉGIN ME, ELLS G and HORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, 80:188-94.
- [3982] KENNY FS, GEE JM, NICHOLSON RI, ELLIS IO, MORRIS TM, WATSON SA, BRYCE RP and ROBERTSON JF. Effect of dietary GLA+/-tamoxifen on the growth, ER expression and fatty acid profile of ER positive human breast cancer xenografts. *Int J. Cancer*, 2001, 92:342-47.
- [3983] JIANG WG, HISCOX S, HORROBIN DF, BRYCE RP and MANSEL RE. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 237:639-44.
- [4007] GUTHRIE N and CARROLL KK. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog. Lipid Res.*, 1999, 38:261-71.
- [4047] IZZOTTI A, CAMOIRANO A, CARTIGLIA C, GRUBBS CJ, LUBET RA, KELLOFF GJ and De FLORA S. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7,12-dimethylbenz(α)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 1999, 59:4285-90.
- [4048] TANG MS, VULIMIRI SV, VIAJE A, CHEN JX, BILOLIKAR DS, MORRIS RJ, HARVEY RG, SLAGA T and DiGIOVANNI J. Both (+/-)syn- and (+/-)anti-7,12-dimethylbenz(α)anthracene-3,4-diol-1,2-epoxides initiate tumors in mouse skin that possess -CAA- to -CTA- mutations at codon 61 of c-H-ras. *Cancer Res.*, 2000, 60:5688-95.
- [4061] EVAN GI and VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, 411:342-48.
- [4080] CHAKRAVARTI D, PELLING JC, CAVALIERI EL and ROGAN EG. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92:10422-26.
- [4081] HOLLANDER MC, KOVALSKY O, SALVADOR JM, KIM KE, PATTERSON AD, HAINES DC and FORNACE AJ. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer Res.*, 2001, 61:2487-91.
- [4155] HWANG D. Fatty acids and immune responses - A new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:431-56.
- [4175] DEVANESAN PD, RAMAKRISHNA NV, PADMAVATHI NS, HIGGINBOTHAM S, ROGAN EG, CAVALIERI EL, MARSCH GA, JANKOWIAK R and SMALL GJ. Identification and quantitation of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, 6:364-71.
- [4176] RAMAKRISHNA NV, DEVANESAN PD, ROGAN EG, CAVALIERI EL, JEONG H, JANKOWIAK R and SMALL GJ. Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz(α)anthracene. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, 5:220-26.

- [4177] CAVALIERI EL and ROGAN EG. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 1995, 25:677-88.
- [4178] RAHMAN KM, SUGIE S, TANAKA T, MORI H and REDDY BS. Effect of types and amount of dietary fat during the initiation phase of hepatocarcinogenesis. *Nutr. Cancer*, 2001, 39:220-25.
- [4198] PRIOR IA and HANCOCK JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J. Cell Sci.*, 2001, 114: 1603-08.
- [4202] SOLANAS M, MORAL R and ESCRICH E. Mecanismos de activación de proto-oncogenes. Papel de la sobreexpresión génica en cáncer de mama. *Oncología*, 2002, 25:243-57.
- [4216] SIMONS K and IKONEN E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387:569-72.
- [4264] COSTA I, SOLANAS M and ESCRICH E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12-dimethylbenz(α)anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2002, 126(8): 915-27.
- [4300] STARK AH and MADAR Z. Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutr. Reviews*, 2002, 60(6): 170-76.
- [4303] SOLANAS M, HURTADO A, COSTA I, MORAL R, MENÉNDEZ JA, COLOMER R and ESCRICH E. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int. J. Oncol.*, 2002, 21(4):745-53.
- [4324] STOLL BA. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *British J. Nut.*, 2002, 87:193-98.
- [4325] BERNARD-GALLON DJ, VISSAC-SABATIER C, ANTOINE-VINCENT D, RIO PG, MAURIZIS JC, FSTIER P and BIGNON YJ. Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *Br. J. Nut.*, 2002, 87: 281-89.
- [4333] MORENO V, GONZÁLEZ JR, SOLER M, BOSCH FX, KOGEVINAS M and BORRÀS JM. Estimación de la incidencia de cáncer en España: período 1993-1996. *Gaceta Sanitaria*, 2001, 15:380-88.
- [4349] WILLET WC. Diet and cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidem., Biomarkers Prev.*, 2001, 10:3-8.
- [4350] WILLET WC. Diet and breast cancer. *J. Internal Med.*, 2001, 249:395-411.
- [4353] TAVANI A, PELUCCHI C, PARPINEL M, NEGRI E, FRANCESCHI S, LEVI F and LA VECCHIA C. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. *Int. J. Cancer*, 2003, 105:113-16.
- [4393] MORAL R, SOLANAS M, GARCÍA G, COLOMER R and ESCRICH E. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol. Rep.*, 2003, 10:1417-24.
- [4399] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer*, 2000, 36(10):1235-47.
- [4401] JIANG WG, HISCOX S, HALLET MB, HORROBIN DF, MANSEL RE and PUNTIS MC. Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res.*, 1995, 55:5043-48.
- [4472] BOTHA JL, BRAY F, SANKILA R and PARKIN DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur. J. Cancer*, 2003, 39:1718-29.
- [4505] POWER KA and THOMPSON LU. Ligand-induced regulation of ER α and ER β is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003, 81:209-21.
- [4506] MAGEE PJ and ROWLAND IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British J. Nut.*, 2004, 91:513-31.
- [4534] NATHANSON KN, WOOSTER R and WEBER BL. Breast Cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Med.*, 2001, 7(5):552-56.
- [4538] IP MM, MASSO-WELCH PA and IP C. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: Role of the stroma and the epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2003, 8:103-18.
- [4539] ROCK CL. Diet and breast cancer: Can dietary factors influence survival? *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.*, 2003, 8(1):119-32.
- [4540] KAPUT J and RODRÍGUEZ RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol. Genomics*, 2004, 16:166-77.
- [4541] JUMP DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences*, 2004, 41(1):41-78.
- [4542] REYES N, REYES I, TIWARI R and GELIEBTER J. Effect on linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.*, 2004, 209:25-35.
- [4543] KHAN SA and HEUVEL JPV. Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *J. Nut. Biochem.*, 2003, 14:554-67.

- [4546] LARSSON S, KUMLIN M, INGELMAN-SUNDBERG M and WOLK A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79:935-45.
- [4547] STULNIG TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2003, 132:310-21.
- [4577] ANDERSON E and CLARKE RB. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2004, 9:3-13.
- [4593] PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LONNING PE, BORRESEN-DALE A-L, BROWN PO and BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406:747-52.
- [4594] SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R *et al.* (17 authors). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *P.N.A.S.*, 2001, 98(19):10869-74.
- [4595] KEEN JC and DAVIDSON NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 2003, 97:825-33.
- [4614] MA DWL, SEO J, DAVIDSON LA, CALLAWAY ES, FAN YY, LUPTON JR and CHAPKIN RS. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J.*, 2004, 18:1040-42.
- [4615] BROWN DA and LONDON E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:17221-24.
- [4623] NAROD SA and FOULKES WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews*, 2004, 4:665-76.
- [4631] OCHOA-HERRERA JJ, HUERTAS JR, QUILES JL and MATAIX J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J. Nut. Biochem.*, 2001, 12:357-64.
- [4647] BRAY F, McCARRON P and PARKIN DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.*, 2004, 6:229-39.
- [4653] HARVEY PW and DARBRE P. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24:167-76.
- [4662] ADLERCREUTZ H. Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 83:113-18.
- [4680] CAVALIERI E, FRENKEL K, LIEHR JG, ROGAN E and ROY D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 2000, 27:75-93.
- [4713] MITRA AK, FARUQUE FS and AVIS AL. Breast cancer and environmental risks: Where is the link? *J. Environm. Health*, 2004, 66:24-32.
- [4722] PARKER BS, ARGANI P, COOK BP, LIANGFENG H, CHARTRAND SD, ZHANG M, SAHA S, BARDELLI A, JIANG Y, MARTIN TBS, NACHT M, TEICHER BA, KLINGER KW, SUKUMAR S and MADDEN SL. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.*, 2004, 64:7857-66.
- [4723] GUO W and GIANCOTTI FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, 5(10):816-26.
- [4735] ESCRICH E, MORAL R, GARCÍA G, COSTA I, SÁNCHEZ JA and SOLANAS M. Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol. Carcinogen.*, 2004, 40:73-78.
- [4736] COSTA I, MORAL R, SOLANAS M and ESCRICH E. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 86:225-35.
- [4737] MORAL R, SOLANAS M, MANZANARES EM, HARO D and ESCRICH E. Influence of DMBA-induced mammary cancer on the liver CPT I, mit HMG-CoA synthase and PPAR α mRNA expression in rats fed low or high corn oil diet. *Int. J. Mol. Med.*, 2004, 14:283-87.
- [4743] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, WÜRTELE G, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Olive-Oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet*, 2000, 1:107-12.
- [4744] MA DWL, SEO J, SWITZER KC, FAN YY, McMURRAY DN, LUPTON JR and CHAPKIN RS. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15:700-06.
- [4765] MORENO JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.*, 2003, 35:1073-81.
- [4802] OWEN RH, HAUBNER R, WÜRTELE G, HULL WE, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2004, 13:319-26.

- [4804] DOWHAN W, MILEYKOVSKAYA E and BOGDANOV M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1666:19-39.
- [4811] SOLANAS M, ESCRICH E, ROUZAUT A, COSTA I, MARTÍNEZ A and NOTARIO V. Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[α]anthracene. *Mol. Carcinog.*, 2002, 33:219-27.
- [4816] TOMASSONI ML, AMORI D and MAGNI MV. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 258:476-81.
- [4818] HULBERT AJ, TURNER N, STORLIEN LH and ELSE PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 2005, 80: 155-69.
- [4822] HULBERG AJ and ELSE PL. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Ann. Rev. Physiol.*, 2000, 62: 207-35.
- [4824] HOLDER JW, ELMORE E and BARRET JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.*, 1993, 53:3475-85.
- [4837] KOSSOY G, MADAR Z, BEN-HUR H, GAL R, STARK A, COHEN O and ZUSMAN I. Transplacental effect of a 15% olive-oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tumors of rat offspring. *Oncol. Rep.*, 2001, 8:1045-49.
- [4861] ALBI E and VIOLA MAGNI, MP. The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell*, 2004, 96: 657-67.
- [4865] HU X, JUNEJA SC, MAIHLE NJ and CLEARY MP. Leptin - a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 94:1704-11.
- [4874] WOGAN GN, HECHT SS, FELTON JS, CONNEY AH and LOEB LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 2004, 14(6):473-86.
- [4895] REYES N, IATROPOULOS M, MITTELMAN A and GELIEBTER J. Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2002, 11Suppl 2:S37-S42.
- [4904] BARTSCH H, NAIR J and OWEN RW. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol. Chem.*, 2002, 383:915-21.
- [4914] FREEMAN MR and SOLOMON KR. Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.*, 2004, 91:54-69.
- [4972] MILES EA, ZOUBOULI P and CALDER PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 2005, 21:389-94.
- [4992] CALDER PC, YAQOUB P, THIES F, WALLACE FA and MILES EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.*, 2002, 87:S31-S48.
- [4994] YAQOUB P, KNAPPER JA, WEBB DH, WILLIAMS CM, NEWSHOLME EA and CALDER PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67:129-35.
- [5041] HUGHES-FULFORD M, CHEN Y and TJANDRAWINATA RR. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 2001, 22:701-05.
- [5127] STARK AH, KOSSOY G, ZUSMAN I, YARDEN G and MADAR Z. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring. *Nutr. Cancer*, 2003, 46(1):59-65.
- [5149] MENENDEZ JA, VELLON L, COLOMER R and LUPU R. Effect of δ -linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, 97:1611-15.
- [5321] ESCRICH E, SOLANAS M and MORAL R. Olive oil, and other dietary lipids, in 575 cancer: experimental approaches. En "Olive Oil and Health", QUILES JL, RAMIREZ-TORTOSA MC, YAQOUB P, CAB International, Oxfordshire, UK, 2006, pp. 317-74.
- [5367] KEY TJ, APPLEBY PN, REEVES GK *et al.* (49 authors). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95:1218-26.
- [5368] LAHMANN PH, HOFFMANN K, ALLEN N *et al.* (41 authors). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer*, 2004, 111:762-71.
- [5423] FRISCH RE, HEGSTED DM and YOSHINAGA K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, 72:4172-76.
- [5447] RAZANI B, WOODMAN SE and LISANTI MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54:431-67.
- [5449] RAJENDRAN L and SIMONS K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.*, 2005, 118:1099-102.
- [5451] SIMONS K and VAZ WLC. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004, 33:269-95.

- [5465] MINEO C, JAMES GL, SMART EJ and ANDERSON RGW. Localization of Epidermal Growth Factor-stimulated Ras/Ras-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:11930-35.
- [5481] ZHUANG L, LIN J, LU ML, SOLOMON KR and FREEMAN MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate Akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2002, 62:2227-31.
- [5484] WALKER SA and LOCKYER PJ. Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci.*, 2004, 117:2879-86.
- [5576] GREEN DR and EVAN GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 2002, 1:19-30.
- [5612] SCHLEY PD, BRINDLEY DN and FIELD CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J. Nutr.*, 2007, 137:548-53.
- [5664] NOGUCHI M, TANIYA T, KOYASAKI N, KUMAKI T, MIYAZAKI I and MIZUKAMI Y. Effects of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on tumorigenesis, tumor proliferation, cell kinetics, and receptor contents of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in Sprague-Dawley rats fed a high- or low-fat diet. *Cancer Res.*, 1991, 51(10):2683-89.
- [5742] E. MARTINEZ DE LA VISTORIA, M. MAÑAS ALMENDROS and J. MARTIN ZÚÑIGA. Nutrición y alimentación. En "Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal". Editores J.M. Zúñiga *et al* Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid-Spain- 2001. Páginas 109-52.
- [5767] KRIS-ETHERTON PM, PEARSON TA, WAN Y, HARGROVE RL, MORIARTY K, FISHELL V and ETHERTON TD. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 70:1009-15.
- [5795] MANN DR and PLANT TM. Leptin and pubertal development. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2002, 20:93-102.
- [5796] AUBERT ML, PIERROZ DD, GRUAZ NM, D'ALLÈVES V, VUAGNAT BAM, PRALONG FP, BLUM WF and SIZONENKO PC. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropéptido Y and leptin. *Mol. Cel. Endocrinol.*, 1998, 140:107-13.
- [5797] CHEUNG CC, THORNTON JE, NURANI SD, CLIFTON DK and STEINER RA. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*, 2001, 74(1):12-21.
- [5812] VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M and MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 160:1-40.
- [5816] HILAKIVI-CLARKE L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2007, 7(5):465-74.
- [5845] OLTRA AM, CARBONELL F, TORMOS C, IRADI A and SÁEZ GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, 30(11):1286-92.
- [5869] ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L and TENA-SEMPERE M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.*, 2008, 29(1):48-69.
- [5879] TODOROVA VK, HARMS SA, KAUFMANN Y, LUO S, LUO KQ, BABB K and KLIMBERG VS. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 88(3):247-56.
- [5887] RAY A, NKHATA KJ, GRANDE JP and CLEARY MP. Diet-induced obesity and mammary tumor development in relation to estrogen receptor status. *Cancer Lett.*, 2007, 253:291-300.
- [5907] OJEDA SR, LOMNICZI A, MASTRONARDI C, HEGER S, ROTH C, PARENT AS, MATAGNE V and MUNGENAST AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?. *Endocrinology*, 2006, 147:1166-74.
- [5963] BINGHAM SA, LUBEN R, WELCH A, WAREHAM N and KHAW KT, Day N. Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet.*, 2003, 362(9379):212-4.
- [5965] MORAL R, SOLANAS M, GARCIA G, GRAU L, VELA E, ESCRICH R and ESCRICH E. High corn oil and high extra virgin olive oil diets have different effects on the expression of differentiation-related genes in experimental mammary tumors. *Oncol. Rep.*, 2008, 20(2):429-35.
- [5967] RUSSO IH and RUSSO J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1978, 61(6):1439-49.
- [5975] DE WAARD F and THIJSEN JHH. Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2005, 97(5):451-8.
- [6051] GALLUS S, BOSETTI C and LA VECCHIA C. Mediterranean diet and cancer risk. *Eur J Cancer Prev.*, 2004, 13(5):447-52.

- [6063] ANBUSELVAM C, VIJAYAVEL K and BALASUBRAMANIAN MP. Protective effect of *Operculina turpethum* against 7,12-dimethyl benz(a)anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. *Chem. Biol. Interact.*, 2007, 20;168(3):229-36.
- [6074] COLLINS AR, DUSINSKÁ M, GEDIK CM and STĚTINA R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104 Suppl 3:465-69.
- [6075] ESTEVE JM, MOMPO J, GARCIA DE LA ASUNCION J, SASTRE J, ASENSI M, BOIX J, VINA JR, VINA J and PALLARDO FV. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J.*, 1999, 13(9):1055-64.
- [6077] KINNULA VL and CRAPO JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 36:718-44.
- [6080] WEINBRENNER T, FITÓ M, DE LA TORRE R, SAEZ GT, RIJKEN P, TORMOS C, COOLEN S, ALBALADEJO MF, ABANADES S, SCHRODER H, MARRUGAT J and COVAS MI. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J. Nutr.*, 2004, 134(9):2314-21.
- [6083] PADMAVATHI R, SENTHILNATHAN P and SAKTHISEKARAN D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, 143(3):349-54.
- [6093] World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. WCRF and AICR. AICR, Washington DC. 2007. 517 pages.
- [6095] OBERLEY LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.*, 2005, 59(4):143-48.
- [6141] MURUGAN RS, MOHAN KV, UCHIDA K, HARA Y, PRATHIBA D and NAGINI S. Modulatory effects of black tea polyphenols on oxidant-antioxidant profile and expression of proliferation, apoptosis, and angiogenesis-associated proteins in the rat forestomach carcinogenesis model. *J. Gastroenterol.*, 2007, 42:352-61.
- [6143] GIULIVI C and CADENAS E. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, 1366(3):265-74.
- [6144] NOMURA K, IMAI H, KOUMURA T, ARAI M and NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:29294-302.
- [6196] COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M and LUNEC J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003, 17(10):1195-214.
- [6290] MICHEL V and BAKOVIC M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell*, 2007, 99:129-40.
- [6302] BOUGNOUX P, GIRAUDEAU B and COUET C. Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, 15(3):416-21.
- [6321] SCHULZ M, HOFFMANN K, WEIKERT C, NÖTHLINGS U, SCHULZE MB and BOEING H. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) - Postdam study. *Br. J. Nutr.*, 2008, 100:942-46.
- [6336] YAQOOB P. The nutritional significance of lipid rafts. *Annu. Rev. Nutr.*, 2009, 29:257-82.
- [6338] SCHMITZ G and ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 2008, 47:147-55.
- [6339] CHAPKIN RS, McMURRAY DN, DAVIDSON LA, PATIL BS, FAN YY and LUPTON JR. Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action. *Br. J. Nutr.*, 2008, 100:1152-57.
- [6422] WAGNER BA, BUETTNER GR and BURNS CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, 1994, 33(15):4449-53.
- [6430] ZMIJEWSKI JW, LANDAR A, WATANABE N, DICKINSON DA, NOGUCHI N and DARLEY-USMAR VM. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, 33:1385-89.
- [6434] CHIARUGI P and FIASCHI T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, 2007, 19:672-82.
- [6440] SUN Y, OBERLEY LW, ELWELL JH and SIERRA-RIVERA E. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. *Int. J. Cancer*, 1989, 44:1028-33.
- [6446] ESWORTHY RS, SWIDEREK KM, HO YS and CHU FF. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1381:213-26.
- [6456] OBERLEY TD and OBERLEY LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.*, 1997, 12(2):525-35.

- [6513] MASELLA R, DI BENEDETTO R, VARÌ R, FILESI C and GIOVANNINI C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005, 16(10):577-86.
- [6517] SCHRAUZER GN. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell Mol. Life Sci.*, 2000, 57(13-14):1864-73.
- [6526] VISIOLI F, COLOMBO C and GALLI C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 245:487-89.
- [6540] CONNEY AH. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: The seventh DeWitt S. Goodman lecture. *Cancer Res.*, 2003, 63:7005-7031.
- [6542] PRINCE M, LI Y, CHILDERS A, ITOH K, YAMAMOTO M and KLEINER HE. Comparison of citrus coumarins on carcinogen-detoxifying enzymes in Nrf2 knockout mice. *Toxicol. Lett.*, 2009, 185(3):180-6.
- [6545] HENDERSON CJ, SMITH AG, URE J, BROWN K, BACON EJ and WOLF CR. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, 95(9):5275-80.
- [6554] KÖHLE C, BOCK KW. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.*, 2007, 73(12):1853-62.
- [6596] WANG Y, LAM KSL and XU A. Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res.*, 2007, 17(4):280-82.
- [6599] FERNÁNDEZ-QUINTELA A, CHURRUCA I and PORTILLO MP. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.*, 2007, 10:1126-31.
- [6609] WIDSCHWENDTER M and JONES PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 2002, 21:5462-82.
- [6611] SCACCINI C, NARDINI M, D'AQUINO M, GENTILI V, DI FELICE M and TOMASSI G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.*, 1992, 33:627-33.
- [6621] BARACALDO C, POVEDA E, ORDÓÑEZ E, RODRÍGUEZ E, AYALA P, DELGADO W and GUERRA M. Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas, como respuesta a la suplementación con aceites vegetales de diferentes fuentes. *Lecturas sobre nutrición*, 2004, 11(1): 36-43.
- [6638] HAN EH, HWANG YP, JEONG TC, LEE SS, SHIN JG and JEONG HG. Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: Bifunctional effects on CYP1 and NAD(P)H:quinine oxidoreductase. *FEBS Lett.*, 2007, 581(4):749-56.
- [6640] NIOI P and HAYES JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat. Res.*, 2004, 555(1-2):149-71.
- [6649] CHOI EJ and KIM T. Daidzein modulates induction of hepatic CYP1A1, 1B1, and AhR by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in mice. *Arch. Pharm. Res.*, 2008, 31(9):1115-9.
- [6658] KRATZ M, Von ECKARDSTEIN A, FOBKER M, BUYKEN A, POSNY N, SCHULTE H, ASSMANN G and WAHRBURG U. The impact of dietary fat composition on serum leptin concentrations in healthy nonobese men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87:5008-14.
- [6661] MESSINIS IE, PAPAGEORGIOU I, MILINGOS S, ASPRODINI E, KOLLIOS G and SEFERIADIS K. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Human Reprod.*, 2001, 16:1827-32.
- [6683] PAOLISSO G, RIZZO MR, MONE CM, TAGLIAMONTE MR, GAMBARDELLA A, RIONDINO M, CARELLA C, VARRICCHIO M and D'ONOFRIO F. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1998, 48:291-97.
- [6691] PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERLAY, J.,TEPPO, L. and THOMAS, D.B. (eds), *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII*, IARC Scientific Publications No. 155, IARC, Lyon, 2002.
- [6692] RUIZ-GUTIÉRREZ V, PÉREZ-ESPINOSA A, VÁZQUEZ CM and SANTA-MARÍA C. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br. J. Nutr.*, 1999, 82(3):233-41.
- [6712] VINOTHINI G, MANIKANDAN P, ANANDAN R and NAGINI S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Azadirachta indica* leaf fractions: modulation of hormone status, xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(8):1852-63.
- [6713] SIERI S, KROGH V, FERRARI P, *et al* (50 authors). Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 88(5):1304-12.
- [6715] RAJNEESH CP, MANIMARAN A, SASIKALA KR and ADAIKAPPAN P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med. J.*, 2008, 49(8):640-43.

- [6720] YUVARAJ S, PREMKUMAR VG, VIJAYASARATHY K, GANGADARAN SG and SACHDANANDAM P. Augmented antioxidant status in Tamoxifen treated postmenopausal women with breast cancer on co-administration with Coenzyme Q10, Niacin and Riboflavin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008, 61(6):933-41.
- [6722] La MERRILL M, KURUVILLA BS, POMP D, BIRNBAUM LS, THREADGILL DW Dietary fat alters body composition, mammary development, and cytochrome p450 induction after maternal TCDD exposure in DBA/2J mice with low-responsive aryl hydrocarbon receptors. *Environ. Health Perspect.*, 2009, 117(9):1414-9.
- [6728] ARIVAZHAGAN S, BALASENTHIL S and NAGINI S. Garlic and neem leaf extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzymes during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced gastric carcinogenesis in rats. *Phytother. Res.*, 2000, 14(4):291-93.
- [6741] SWEDENBORG E and PONGRATZ I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology*, 2010, 268(3):132-8.
- [6742] SHIMADA T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 2006, 21(4):257-76.
- [6753] DOMITROVIC R, TOTA M and MILIN C. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2006, 113(2):177-91.
- [6756] NAVARRO J, OBRADOR E, CARRETERO J, PETSCHEN I, AVIÑÓ J, PEREZ P and ESTRELA JM. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(3-4):410-18.
- [6759] VOEHRINGER DW, MCCONKEY DJ, MCDONNELL TJ, BRISBAY S and MEYN RE. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(6):2956-60.
- [6760] ESTRELA JM, ORTEGA A and OBRADOR E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2006, 43(2):143-81.
- [6761] OBRADOR E, NAVARRO J, MOMPO J, ASENSI M, PELLICER JA and ESTRELA JM. Regulation of tumour cell sensitivity to TNF-induced oxidative stress and cytotoxicity: role of glutathione. *Biofactors*, 1998, 8(1-2):23-26.
- [6762] HIETANEN E, BARTSCH H, AHOTUPA M, BÉRÉZIAT JC, BUSSACCHINI-GRIOT V, CABRAL JR, CAMUS AM, LAITINEN M and WILD H. Mechanisms of fat-related modulation of N-nitrosodiethylamine-induced tumors in rats: organ distribution, blood lipids, enzymes and pro-oxidant state. *Carcinogenesis*, 1991, 12(4):591-600.
- [6764] YEH CC, HOU MF, WU SH, TSAI SM, LIN SK, HOU LA, MA H and TSAI LY. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 2006, 24(6):555-59.
- [6765] LEUNG HY, YUNG LH, SHI G, LU AL and LEUNG LK. The red wine polyphenol resveratrol reduces polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage in MCF-10A cells. *Br. J. Nutr.*, 2009, 102(10):1462-8.
- [6766] LEUNG HY, YUNG LH, POON CH, SHI G, LU AL and LEUNG LK. Genistein protects against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced oxidative DNA damage in non-cancerous breast cells MCF-10A. *Br. J. Nutr.*, 2009, 101(2):257-62.
- [6769] XUE W and WARSHAWSKY D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 206:73-93.
- [6770] SHIRAIISHI R, FUJISTE T, KUROKI T, KAKIMOTO T, MIAO L, SAKATA Y, TSUNADA S, NODA T, IWAKIRI R and FUJIMOTO K. Long-term ingestion of reduced glutathione suppressed an accelerating effect of beef tallow diet on colon carcinogenesis in rats. *J. Gastroenterol.*, 2009, 44(10):1026-35.
- [6823] BOYAPATI SM, SHU XO, GAO YT, DAI Q, YU H, CHENG JR, JIN F and ZHENG W. Correlation of blood sex steroid hormones with body size, body fat distribution, and other known risk factors for breast cancer in postmenopausal Chinese women. *Cancer Causes Control*, 2004, 15:305-11.
- [6827] OI-KANO Y, KAWADA T, WATANABE T, KOYAMA F, WATANABE K, SENBONGI R and IWAI K. Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2007, 18(10):685-92.
- [6828] ROSNER B, COLDITZ GA and WILLETT WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1994, 139:819-35.
- [6850] FERGUS LR and PHILPOTT M. Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2008, 28:313-329.
- [6852] CHEN C and KONG AN. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 36(12):1505-16.
- [6864] KOCH MA. Experimental modeling and research methodology. In Suckow, M.A, Weisbroth, S.H and Franklin, C.L. (eds) "The laboratory rat". Elsevier, pp. 587-625, 2006.
- [6879] SOLANAS M, GRAU L, MORAL R, VELA E, ESCRICH R and ESCRICH E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21ras signalling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis*, 2010, 31(5):871-79.

- [6887] MORAL R, ESCRICH R, SOLANAS M, VELA E, COSTA I, RUÍZ DE VILLA MC and ESCRICH E. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats. *Nutr. Cancer*, 2011, 63(3):410-20.
- [6888] BRUNNER LJ and BAI S. Effect of dietary oil intake on hepatic cytochrome P450 activity in the rat. *J. Pharm. Sci.*, 2000, 89(8):1022-7.
- [6889] ELBARBRY FA, McNAMARA PJ and ALCORN J. Ontogeny of hepatic CYP1A2 and CYP2E1 expression in rat. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2007, 21, 41-50.
- [6890] MURRAY M. Role of signalling systems in the effects of dietary factors on the expression of mammalian CYPs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2007, 3(2):185-96.
- [6897] BOSCH A, EROLES P, ZARAGOZA R, VIÑA JR and LLUCH A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.*, 2010, 36(3):206-15.
- [6905] HABIG WH, PABST MJ and JAKOBY WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249(22):7130-9.
- [6907] KENNEDY SW and JONES SP. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Anal. Biochem.*, 1994, 222(1):217-23.
- [6908] BURKE MD and MAYER RT. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.*, 1974, 2(6):583-8.
- [6931] BERNSTEIN C, BERNSTEIN H, PAYNE CM and GAREWAL H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2002, 511(2):145-78.
- [6932] MITRA S, IZUMI T, BOLDOGH I, BHAKAT KK, HILL JW and HAZRA TK. Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33(1):15-28.
- [6934] TUDEK B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol. Aspects Med.*, 2007, 28(3-4):258-75.
- [6936] TUDEK B, SWOBODA M, KOWALCZYK P and OLINSKI R. Modulation of oxidative DNA damage repair by the diet, inflammation and neoplastic transformation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2006, 57(1):7:33-49.
- [6966] SKIN JH, HUR JY, SEO HS, JEONG YA, LEE JK, OH MJ, KIM T, SAW HS and KIMS H. The ratio of ER α to ER β in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 2007, 72:592-99.
- [6969] ROWLANDS JC, HE L, HAKKAK R, RONIS MJJ and BADGER TM. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J. Nutr.*, 2001, 131:3281-3287.
- [6998] RICH KJ and BOOBIS AR. Expression and inducibility of P450 enzymes during liver ontogeny. *Microsc. Res. Tech.*, 1997, 39(5):424-35.
- [7002] KAWAJIRI K and FUJII-KURIYAMA Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 464(2):207-12.
- [7022] ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358:1148-59.
- [7062] MUSGROVE EA and SUTHERLAND RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9:631-43.
- [7086] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A and BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, 454:436-44.
- [7102] ROMAGUERA D, NORAT T, VERGNAUD AC *et al.* (51 authors). Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 92:912-21.
- [7105] HASHIM YZ, ENG M, GILL CI, McGLYNN H and ROWLAND IR. Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr. Rev.*, 2005, 63(11):374-86.
- [7107] WILLETT WC, SACKS F, TRICHOPOULOU A, DRESCHER G, FERRO-LUZZI A, HELSING E and TRICHOPOULOS D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, 61(6):1402S-1406S.
- [7108] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C and PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*, 2010, 127:2893-917.
- [7144] SOTO-GUZMÁN A, NAVARRO-TITO N, CASTRO-SANCHEZ L, MARTINEZ-OROZCO R and SALAZAR EP. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2010, 27:505-15.
- [7145] MacLENNAN M and MA DWL. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2010, 12:211.

- [7146] PRENTICE RL, CAAN B, CHLEBOWSKI RT, PATTERSON R, *et al.* (38 authors). Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *J.A.M.A.*, 2006, 295(6):629-42.
- [7147] MAYNE ST. Women's Health Initiative: complex answers to simple questions on dietary fat and breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2006, 3(6):285.
- [7149] DAVIDSON LA, WANG N, SHAH MS, LUPTON JR, IVANOV I and CHAPKIN RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding micro RNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, 2009, 30:2077-84.
- [7151] SPENCER L, MANN C, METCALFE M, WEBB M, POLLARD C, SPENCER D, BERRY D, STEWARD W and DENNISON A. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur. J. Cancer*, 2009, 45:2077-86.
- [7152] DIMRI M, BOMMI PV, SAHASRABUDDHE AA, KHANDEKAR JD and DIMRI GP. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010, 31:489-95.
- [7154] HAMMAMIEH R, CHAKRABORTY N, MILLER SA, WADDY E, BARMADA M, DAS R, PEEL SA, DAY AA and JETT M. Differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007, 101:7-16.
- [7158] DICKSON RB, THOMPSON EW and LIPPMAN ME. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1990, 37:305-16.
- [7159] PÉREZ-JIMÉNEZ F, RUANO J, PÉREZ-MARTINEZ P, LOPEZ-SEGURA F and LOPEZ-MIRANDA J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Bratisl. Lek. Listy.*, 2003, 104(7-8):218-21.
- [7168] BORRELLI F and IZZO AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol.*, 2009, 23(1):33-49.
- [7173] NGUYEN LP and BRADFIELD CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, 21:102-116.
- [7174] MIAO W, HU L, SCRIVENS PJ and BATIST G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280(21):20340-8.
- [7176] DIETRICH C and KAINA B. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*. 2010, 31(8):1319-28.
- [7177] FU J, ASTARITA G, GAETANI S, KIM J, CRAVATT BF, MACKIE K and PIOMELLI D. Food intake regulates Oleoylethanolamide formation and degradation in the proximal small intestine. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282:1518-28.
- [7178] RODRÍGUEZ DE FONSECA F, NAVARRO M, GÓMEZ R, ESCUREDO L, NAVA F, FU J, MURILLO-RODRÍGUEZ E, GIUFFRIDA A, LO VERME J, GAETANI S, KATHURLA S, GALL C and PIOMELLI D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 2001, 414(6860):209-12.
- [7182] MARLOWE JL and PUGA A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J. Cell. Biochem.*, 2005, 96(6):1174-84.
- [7190] IRIGARAY P and BELPOMME D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 2010, 31(2):135-48.
- [7204] ASAOKA Y, SAKAI H, SASAKI J, GORYO M, YANAI T, MASEGI T and OKADA K. Changes in the gene expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 in juvenile Sprague-Dawley rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 2010, 72(4):471-9.
- [7206] THABUIS C, TISSOT-FAVRE D, BEZELGUES JB, MARTIN JC, CRUZ-HERNANDEZ C, DIONISI F and DESTAILLATS F. Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. *Lipids*, 2008, 43:887-94.
- [7208] LIEHR JG and RICCI MJ. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93(8):3294-6.
- [7210] LO VERME J, GAETANI S, FU J, OVEISI F, BURTON K and PIOMELLI D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62:708-16.
- [7212] GONZÁLEZ-YANES C, SERRANO A, BERMÚDEZ-SILVA FJ, HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ M, PÁEZ-OCHOA MA, RODRÍGUEZ DE FONSECA F and SÁNCHEZ-MARGALET V. Oleoylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2005, 289:E923-E29.
- [7215] BELOUS AR, HACHEY DL, DAWLING S, ROODI N and PARL FF. Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res.*, 2007, 67(2):812-7.

- [7218] SERRANO A, PAVÓN FJ, TOVAR S, CASANUEVA F, SEÑARÍS R, DIÉGUEZ C and RODRÍGUEZ DE FONSECA F. Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology*, 2011, 60:593-601.
- [7241] SANTELLA RM and ZHANG YJ. Immunologic detection of benzo(a)pyrene-DNA adducts. *Methods Mol. Biol.*, 2011, 682:271-8.
- [7249] MANTOVANI A. Cancer-related inflammation: the seventh hallmark of cancer. En "American Society of Clinical Oncology", ASCO Educational Book, 2009, 723-26.
- [7254] KÖHLE C and BOCK KW. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 72(7):795-805.
- [7304] FIEGL H, MILLINGER S, MUELLER-HOLZNER E, MARTH C, ENSINGER C, BERGER A, KLOCKER H, GOEBEL G and WIDSCHWENDTER M. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.*, 2005, 65:1141-45.
- [7307] JOVANOVIĆ J, RONNEBERG JA, TOST J and KRISTENSEN V. The epigenetics of breast cancer. *Mol. Oncol.*, 2010, 4:242-54.
- [7310] MARTENS JWM, NIMMIRICH I, KOENIG T *et al.* (19 authors). Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res.*, 2005, 65:4101-17.
- [7318] WIDSCHWENDTER M, SIEGMUND KD, MÜLLER HM, FIEGL H, MARTH C, MÜLLER-HOLZNER E, JONES PA and LAIRD PW. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.*, 2004, 64:3807-13.
- [7344] DINKOVA-KOSTOVA AT and TALALAY P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, 501(1):116-23.
- [7345] GONG X, KOLE L, ISKANDER K and JAISWAL AK. NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20s proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res.*, 2007, 67(11):5380-8.
- [7349] HANAHAN D and WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-74.
- [7368] GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR and KARIN M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 2010, 140(6):883-99.
- [7375] ESCRICH E, SOLANAS M, MORAL R and ESCRICH R. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 2011, 17(8):813-30.
- [7382] SAVAS U and JEFCOATE CR. Dual regulation of cytochrome P450EF expression via the aryl hydrocarbon receptor and protein stabilization in C3H/10T1/2 cells. *Mol. Pharmacol.*, 1994, 45(6):1153-9.
- [7384] MURRAY GI, MELVIN WT, GREENLEE WF and BURKE MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, 41, 297-316.
- [7386] AGUIAR M, MASSE R and GIBBS BF. Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metab. Rev.*, 2005, 37(2):379-404.
- [7388] BANDIERA S, WEIDLICH S, HARTH V, BROEDE P, KO Y and FRIEDBERG T. Proteasomal degradation of human CYP1B1: effect of the Asn453Ser polymorphism on the post-translational regulation of CYP1B1 expression. *Mol. Pharmacol.*, 2005, 67(2):435-43.
- [7389] McMILLAN BJ and BRADFIELD CA. The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(4):1412-7.
- [7390] WANG H and LEUNG LK. The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutrition*, 2010, 26(11-12):1181-7.
- [7391] FUJII-KURIYAMA Y and MIMURA J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338(1):311-317.
- [7392] NEERGHEEN VS, BAHORUN T, TAYLOR EW, JEN LS and ARUOMA OI. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 2010, 278(2):229-41.
- [7395] LAU HH, COFFING SL, LEE H, HARVEY RG and BAIRD WM. Stereoselectivity of activation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-3,4-dihydrodiol to the anti-diol epoxide metabolite in a human mammary carcinoma MCF-7 cell-mediated V79 cell mutation assay. *Chem. Res. Toxicol.*, 1995, 8(7):970-8.
- [7396] PETER GUENGERICH F, CHUN YJ, KIM D, GILLIAM EM and SHIMADA T. Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutat. Res.*, 2003, 523-524:173-82.

- [7412] HIGGINS LG and HAYES JD. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.*, 2011, 43(2):92-137.
- [7413] TAGUCHI K, MOTOHASHI H and YAMAMOTO M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011. 16(2):123-40.
- [7414] SLOCUM SL and KENSLER TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch. Toxicol.*, 2011, 85:273-284.
- [7415] BRAUZE D, WIDERAK M, CWYKIEL J, SZYFTER K and BAER-DUBOWSKA W. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1a, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicol. Lett.*, 2006, 167:212-220.
- [7418] POLLENZ RS. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem. Biol. Interact.*, 2002, 141(1-2):41-61.
- [7419] DOUGHERTY EJ and POLLENZ RS. Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicol. Sci.*, 2008, 103(1):191-206.
- [7449] VATER ST, BALDWIN DM and WARSHAWSKY D. Hepatic metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in male, female, and ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.*, 1991, 51(2):492-8.
- [7475] MOUSSAVI N, GAVINO V and RECEVEUR O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity?. *Obesity*, 2008, 16(1):7-15.
- [7482] PIERS LS, WALKER KZ, STONEY RM, SOARES MJ and O'DEA K. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. *Br. J. Nutr.*, 2003, 90(3):717-27.
- [7493] ESTRUCH R. Anti-inflammatory effects of Mediterranean diet: the experience of the Predimed study. *Proc. Nutr. Soc.*, 2010, 69(3):333-40.
- [7494] SHAI I, SCHWARZFUCHS D, HENKIN Y *et al.* (23 authors). Weight loss with a low-carbohydrate, mediterranean or low-fat diet. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 359:229-41.
- [7495] FU J, OVEISI F, GAETANI S, LIN E and PIOMELLI D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, 2005, 48:1147-53.
- [7519] SIEGEL R, NAISHADHAM D and JEMAL A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 2012, 62:10-29.
- [7541] JARDÉ T, PERRIER S, VASSON MP and CALDEFIE-CHÉZET F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 2011, 47(1):033-43.
- [7542] JEONG YJ, BONG JG, PARK SH, CHOI JH and OH HK. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma *in situ* and invasive breast cancer. *J. Breast Cancer*, 2011, 14(2):96-103.
- [7546] GROSSMANN ME, RAY A, DOGAN S, MIZUNO NK and CLEARY MP. Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth. *Cell Res.*, 2008, 18(11):1154-56.
- [7553] CHANDRAN M, PHILLIPS SA, CIARALDI T and HENRY RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. *Diabetes Care*, 2003, 26(8):2442-50.
- [7616] RUDEL RA, FENTON SE, ACKERMAN JM, EULING SY and MAKRIS SL. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ. Health Perspect.*, 2011, 119:1053-61.
- [7619] PINILLA L, AGUILAR E, DIEGUEZ C MILLAR RP and TENA-SEMPERE M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 2012, 92:1235-316.
- [7620] DA SILVA FARIA T, DA FONTE RAMOS C and SAMPAIO FJB. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15:123-27.
- [7622] JARDÉ T, CALDEFIE-CHÉZET F, DAMEZ M, MISHHELLANY F, PENAULT-LLORCA F, GUILLOT J and VASSON MP. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2008, 19:905-11.
- [7624] EVANS RM, BARISH GD and WANG YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.*, 2004, 10:355-61.
- [7625] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, GARCÍA-ARELLANO A, TOLEDO E *et al* (21 authors). A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PlosONE*, 2012, 7:e43134.
- [7627] PARSA P and PARSA B. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asoc. Pac. J. Cancer Prev.*, 2009, 10:545-50.
- [7628] HALÁSZ B, KÖVES K, MOLNÁR J, BALIKA K, STOLL V and KOVÁCS G. Hypothalamus and puberty. *Brain Res. Bull.*, 1988, 20:709-12.
- [7629] MAEDA KI, OHKURA S, UENOYAMA Y, WAKABAYASHI Y, OKA Y, TSUKAMURA H and OKAMURA H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.*, 2010, 1364:103-15.

- [7630] SANTORO N, FILICORI M and CROWLEY WF. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.*, 1986, 7:11-23.
- [7631] KELCH RP, HOPWOOD NJ, SAUDER S and MARSHALL JC. Evidence for decreased secretion of gonadotropin-releasing hormone in pubertal boys during short-term testosterone treatment. *Pediatr. Res.*, 1985, 19:112-17.
- [7632] BELCHETZ PE, PLANT TM, NAKAI Y, KEOGH EJ and KNOBIL E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 1978, 202:631-33.
- [7633] TERASAWA E, KURIAN JR, GUERREIRO KA, KENEALY BP, HUTZ ED and KEEN KL. Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J. Neuroendocrinol.*, 2010, 22:630-38.
- [7634] SISK CL, RICHARDSON HN, CHAPPELL PE and LEVINE JE. In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. *Endocrinology*, 2001, 142:2929-36.
- [7637] OJEDA SR, LOMNICZI A and SANDAU US. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.*, 2008, 20:732-42.
- [7644] LEHMAN MN, COOLEN LM and GOODMAN RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 2010, 151:3479-89.
- [7646] NAVARRO VM, GOTTSCH ML, CHAVKIN C, OKAMURA H, CLIFTON DK and STEINER RA. Regulation of gonadotropin-releasing secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J. Neurosci.*, 2009, 29:11859-66.
- [7651] WAKABAYASHI Y, NAKADA T, MURATA K *et al.* (12 authors). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.*, 2010, 30:3124-32.
- [7653] CHRISTIAN CA and MOENTER SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr. Rev.*, 2010, 31:544-77.
- [7655] LORINCZ AM and SUKUMAR S. Molecular link between obesity and breast cancer. *Endocr. Rel. Cancer*, 2006, 13:279-92.
- [7656] AHIMA RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 2006, 5:242S-48S.
- [7657] SOMASUNDAR P, McFADDEN DW, HILEMAN SM and VONA-DAVIS L. Leptin is a growth factor in cancer. *J. Surg. Res.*, 2004, 116:337-49.
- [7658] MICHALAKIS K, MINTZIORI G, KAPRARAS A, TARLATZIS BC and GOULIS DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 2012, 62:457-78.
- [7663] ISHIKAWA M, KITAYAMA J and NAGAWA H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10:4325-31.
- [7664] GERELTSETSEG G, MATSUZAKI T, IWASA T, KINOCHI R, NAKAZAWA H, YAMAMOTO S, KUWAHARA A, YASUI T and IRAHARA M. Delay in the onset of puberty of intrauterine growth retarded female rats cannot be rescued with hypernutrition after birth. *Endocr. J.*, 2012, 59:963-72.
- [7666] ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N *et al.* (19 authors). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 425:560-64.
- [7667] WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, HOTTA K, MATSUZAWA Y, PRATLEY RE and TATARANI PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86:1930-35.
- [7668] KNERR I, SCHUSTER S, NOMIKOS P, BUCHFELDER M, DÖTSCH J, SCOOF E, FAHLBUSCH R and RASCHER W. Gene expression of adrenomedullin, leptin, their receptors and neuropeptide Y in hormone-secreting and non-functioning pituitary adenomas, meningiomas and malignant intracranial tumours in humans. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2001, 27:215-22.
- [7669] WANG XJ, YUAN SL, LU Q, LU YR, ZHANG J, LIU Y and WANG WD. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2004, 10:2478-81.
- [7670] MANTZOROS C, PETRIDOU E, DESSYPRIS N, CHAVELAS C, DALAMAGA M, ALEXE DM, PAPADIAMANTIS Y, MARKOPOULOS C, SPANOS E, CHROUSOS G and TRICHOPOULOS D. Adiponectin and breast cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89:1102-07.
- [7671] RUSSO J and RUSSO IH. Development of the human breast. *Maturitas*, 2004, 49:2-15.
- [7672] POLLÁN M, PASTOR-BARRIUSO R, ARDANAZ E *et al.* (28 authors). Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, 101:1584-91.
- [7673] BORRÀS J, AMEIJIDE A, VILARDELL L, VALLS J, MARCOS-GRAGERA R and IZQUIERDO A. Trends in cancer incidence in Catalonia, 1985-2002. *Med. Clin. (Barc.)*, 2008, 131Suppl1:11-18.

- [7674] MARCOS-GRAGERA R, CARDÓ X, GALCERAN J, RIBES J, IZQUIERDO A and BORRÀS J. Cancer incidence in Catalonia, 1998-2002. *Med. Clin. (Barc.)*, 2008, 131Suppl1:04-10.
- [7675] TERRY PD and ROHAN TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, 11:953-71.
- [7676] GRAY J, EVANS N, TAYLOR B, RIZZO J and WALKER M. State of the evidence. The connection between breast cancer and the environment. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 2009, 15:43-78.
- [7677] DIVISI D, DI TOMMASO S, SALVEMINI S, GARRAMONE M and CRISCI R. Diet and cancer. *Acta Biomed.*, 2006, 77:118-23.
- [7678] BRODY JG and RUDEL RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, 2003, 111:1007-19.
- [7679] CABARAVDIC M. Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer. *Med. Arh.*, 2006, 60(6 Suppl.):97-100.
- [7681] QIN XY, ZAHA H, NAGANO R, YOSHINAGA J, YONEMOTO J and SONE H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol. Lett.*, 2011, 206:152-57.
- [7682] ARTANDI SE and DEPINHO RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 2010, 31:9-18.
- [7683] FREED-PASTOR WA and PRIVES C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.*, 2012, 26:1268-86.
- [7684] NELSON BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.*, 2008, 222:101-16.
- [7685] FERRONE C and DRANOFF G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28:4045-51.
- [7686] BINDEA G, MLECNIK B, FRIDMAN WH, PAGÈS F and GALON J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, 22:215-22.
- [7687] LYNCH HT, SNYDER C and LYNCH J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann. Surg. Oncol.*, 2012, 19:1723-31.
- [7688] LEE EYHP and MULLER WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, 2:a003236.
- [7689] MILLER WR. Aromatase and the breast: regulation and clinical aspects. *Maturitas*, 2006, 54:335-41.
- [7692] WILLET WC. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol. Sci.*, 1999, 52:S127-S46.
- [7693] YANG L, PANG Y and MOSES HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 2010, 31:220-27.
- [7694] SHIELDS JD, KOURTIS IC, TOMEI AA, ROBERTS JM and SWARTZ MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 2010, 328:749-52.
- [7695] DE NARDO DG, ANDREU P and COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29:309-16.
- [7696] QIANBZ and POLLARDJW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010, 141:39-51.
- [7697] KARNOUB AE and WEINBERG RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.*, 2006-2007, 26:75-85.
- [7698] DeBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G and THOMPSON CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, 2008, 7:11-20.
- [7699] HSU PP and SABATINI DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 2008, 134:703-07.
- [7700] JONES RG and THOMPSON CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.*, 2009, 23:537-48.
- [7701] DIGIOVANNI J and JUCHAU MR. Biotransformation and bioactivation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (7,12-DMBA). *Drug Metab. Rev.*, 1980, 11:61-101.
- [7711] ESCRICH E, MORAL R and SOLANAS M. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet, and breast cancer. *Public Health Nutr.*, 2011, 14:2323-32.
- [7759] SCOLLEN S, LUCCARINI C, BAYNES C *et al.* (13 authors). TGF- β signalling pathway and breast cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2011, 20:1112-19.
- [7789] DAS SK and HOEFLER G. The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. *Trends Mol. Med.*, 2013, 19:292-301.

- [7849] SISSUNG TM, PRICE DK, SPARREBOOM A and FIGG WD. Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. *Mol. Cancer Res.*, 2006, 4(3):135-50.
- [7850] HARPER PA, RIDDICK DS and OKEY AB. Regulating the regulator: Factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 72:267-279.
- [7852] SHIMBA S, HAYASHI M, OHNO T and TEZUKA M.. Transcriptional regulation of the AhR gene during adipose differentiation. *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, 26(9):1266-71.
- [7853] BUSBEE PB, ROUSE M, NAGARKATTI M and NAGARKATTI PS. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr. Rev.*, 2013, 71:353-369.
- [7854] ZHANG S, QIN C and SAFE SH. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect.*, 2003, 111(16):1877-1882.
- [7905] KOHLMEIER L, SIMONSEN N and MOTTUS K. Dietary modifiers of carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 1995, 103:177-184.
- [7906] SHU L, CHEUNG KL, KHOR TO, CHEN C and KONG AN. Phytochemicals: cancer chemoprevention of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29:483-502.
- [7907] BOSETTI C, PELUCCHI C and La VECCHIA C. Diet and cancer in Mediterranean countries: carbohydrates and fats. *Public Health Nutr.*, 2009, 12(9A):1595-600.
- [7908] CARAMIA G, GORI A, VALLI E and CERRETANI L. Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2012, 114(4):375-88
- [7909] de ZWARD L, SCHOLTEN M, MONBALIU JG, ANNAERT PP, VAN HOUTD JM, VAN DEN WYNGAERT I, De SCHAEPDRIJVER LM, BAILEY GP, COOGAN TP, COUSSEMENT WC and MANNENS GS. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. *Reprod. Toxicol.*, 2008, 26:220-230.
- [7923] TAN AS and BERRIDGE MV. Evidence for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-mediated quinone-dependent redox cycling via plasma membrane electron transport: A sensitive cellular assay for NQO1. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, 48(3):421-9.
- [7924] PROCHASKA HJ and SANTAMARIA AB. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.*, 1988, 169(2):328-36.
- [7989] CHOU MW, YANG SK, SYDOR W and YANG CS. Metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and 7-hydroxymethyl-12-methylbenz(a)anthracene by rat liver and microsomes. *Cancer Res.*, 1981, 41(4):1559-64.
- [7991] McMILLAN DC, FU PP and CERNIGLIA CE. Stereoselective fungal metabolism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: identification and enantiomeric resolution of a K-region dihydrodiol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(10):2560-6.
- [8018] VISIOLI F and GALLI C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2002, 42(3):209-21.
- [8023] DENISON MS and NAGY SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, 43:309-34.
- [8026] WILD CP. Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, 14(8):1847-50.
- [8028] HAYES JD, FLANAGAN JU and JOWSEY IR. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, 45:51-88.
- [8033] ROWLAND A, MINERS JO and MACKENZIE PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2013, 45(6):1121-32.
- [8034] OAKLEY A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.*, 2011, 43(2):138-51.
- [8035] TEW KD, MANEVICH Y, GREK C, XIONG Y, UYS J and TOWNSEND DM. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, 51(2):299-313.
- [8036] VOGEL C and MARCOTTE EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.*, 2012, 13(4):227-32.
- [8037] HALBEISEN RE, GALGANO A, SCHERRER T and GERBER AP. Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2008, 65(5):798-813.
- [8039] SINGH D, KASHYAP A, PANDEY RV and SAINI KS. Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug. Discov. Today*, 2011, 16(17-18):793-9.
- [8040] YOKOI T and NAKAJIMA M. microRNAs as mediators of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2013, 53:377-400.

- [8041] PEREZ-LEAL O, BARRERO CA and MERALI S. Translational control of Nrf2 within the open reading frame. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, 437(1):134-9.
- [8042] CORREIA MA. Hepatic cytochrome P450 degradation: Mechanistic diversity of the cellular sanitation brigade. *Drug Metab. Rev.*, 2003, 35(2-3): 107-143.
- [8043] SIEGEL D, ANWAR A, WINSKI SL, KEPKA JK, ZOLMAN KL and ROSS D. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol. Pharmacol.*, 2001, 59(2):263-8.
- [8044] KORASHY HM and EL-KADI AO. Transcriptional and posttranslational mechanisms modulating the expression of the cytochrome P450 1A1 gene by lead in HepG2 cells: a role of heme oxygenase. *Toxicology*, 2012, 291(1-3):113-21.
- [8045] EL GENDY MA, SOSHILOV AA, DENISON MS and EL-KADI AO. Transcriptional and posttranslational inhibition of dioxin-mediated induction of CYP1A1 by harmine and harmol. *Toxicol. Lett.*, 2012, 208(1):51-61.
- [8046] BALCHIM D, STOYCHEV SH and DIRR HW. S-Nitrosation destabilizes glutathione transferase P1-1. *Biochemistry*, 2013, 52(51):9394-402.
- [8048] OESCH-BARTLOMOWICZ B and OESCH F. Phosphorylation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 392(6):1085-92.
- [8049] SEIDEL SD1, WINTERS GM, ROGERS WJ, ZICCARDI MH, LI V, KESER B and DENISON MS. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2001, 15(4):187-96.
- [8050] MOON YJ, WANG X and MORRIS ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro*, 2006, 20(2):187-210.
- [8051] OLEAGA C, GARCÍA M, SOLÉ A, CIUDAD CJ, IZQUIERDO-PILUDO M and NOÉ V. CYP1A1 is overexpressed upon incubation of breast cancer cells with a polyphenolic cocoa extract. *Eur. J. Nutr.*, 2012, 51(4):465-76.
- [8052] POON CH, WONG TY, WANG Y, TSUCHIYA Y, NAKAJIMA M, YOKOI T and LEUNG LK. The citrus flavanone naringenin suppresses CYP1B1 transactivation through antagonising xenobiotic-responsive element binding. *Br. J. Nutr.*, 2013, 109(9):1598-605.
- [8053] IWANO H, UJITA W, NISHIKAWA M, ISHII S, INOUE H and YOKOTA H. Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2014, 65(2):241-4.
- [8054] SZAEFER H, KRAJKA-KUZNIAK V, IGNATOWICZ E, ADAMSKA T and BAER-DUBOWSKA W. Evaluation of the effect of beetroot juice on DMBA-induced damage in liver and mammary gland of female Sprague-Dawley rats. *Phytother. Res.*, 2014, 28(1):55-61.
- [8055] SZAEFER H, KRAJKA-KUZNIAK V, IGNATOWICZ E, ADAMSKA T and BAER-DUBOWSKA W. The effect of cloudy apple juice on hepatic and mammary gland phase I and II enzymes induced by DMBA in female Sprague-Dawley rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 2014, 37(4):472-9.
- [8056] ANGRISH MM, METS BD, JONES AD and ZACHAREWSKI TR. Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.*, 2012, 128(2):377-86.
- [8057] YOKOTANI K, CHIBA T, SATO Y, NAKANISHI T, MURATA M and UMEGAKI K. Influence of dietary macronutrients on induction of hepatic drug metabolizing enzymes by *Coleus forskohlii* extract in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2013, 59(1):37-44.
- [8059] SAGHIR SA, KHAN SA and McCOY AT. Ontogeny of mammalian metabolizing enzymes in humans and animals used in toxicological studies. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2012, 42(5):323-57.
- [8063] CUI JY, RENAUD HJ and KLAASSEN CD. Ontogeny of novel cytochrome P450 gene isoforms during postnatal liver maturation in mice. *Drug. Metab. Dispos.*, 2012, 40(6):1226-37.
- [8069] DONATO MT. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Citocromo P450, 2003, pag.:29-62.
- [8070] NISHIMURA M and NAITO S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 2006, 21(5):357-74.
- [8071] CARMICHAEL J, FORRESTER LM, LEWIS AD, HAYES JD, HAYES PC and WOLF CR. Glutathione S-transferase isoenzymes and glutathione peroxidase activity in normal and tumour samples from human lung. *Carcinogenesis*, 1988, 9(9):1617-21.
- [8072] WOLF CR, LEWIS AD, CARMICHAEL J, ADAMS DJ, ALLAN SG and ANSAELL DJ. The role of glutathione in determining the response of normal and tumor cells to anticancer drugs. *Biochem. Soc. Trans.*, 1987, 15(4):728-30.
- [8073] NEVERT DW. Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol. Endocrinol.*, 1991, 5(9):1203-14.

- [8074] LI W, DONAT S, DÖHR O, UNFRIED K and ABEL J. Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, 315(2):279-84.
- [8075] ABBOTT B, BIRNBAUM LS and PERDEW GH. Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev. Dyn.*, 1995, 204(2):133-43.
- [8076] SHIH H, PICKWELL GV and QUATTROCHI LC. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 373(1):287-94.
- [8077] BEISCHLAG TV, LUIS MORALES J, HOLLINGSHEAD BD and PERDEW GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 2008, 18(3):207-50.
- [8078] MITCHELL KA and ELFERINK CJ. Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 77(6):947-56.
- [8079] CHIARO CR, PATEL RD, MARCUS CB and PERDEW GH. Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome p450 autoregulatory pathway. *Mol. Pharmacol.*, 2007, 72(5):1369-79.
- [8080] NGUYEN T, SHERRATT PJ, HUANG HC, YANG CS and PICKETT CB. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(7):4536-41.
- [8081] McMAHON M, ITOH K, YAMAMOTO M and HAYES JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(24):21592-600.
- [8082] KWAK MK, ITOH K, YAMAMOTO M, SUTTER TR and KENSLER TW. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol. Med.*, 2001, 7(2):135-45.
- [8083] RAMOS-GOMEZ M, KWAK MK, DOLAN PM, ITOH K, YAMAMOTO M, TALALAY P and KENSLER TW. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001 Mar 13;98(6):3410-5.
- [8084] BAIRD L and DINKOVA-KOSTOVA AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.*, 2011, 85(4):241-72.
- [8085] LI W, THAKOR N, XU EY, HUANG Y, CHEN C, YU R, HOLCIK M and KONG AN. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38(3):778-88.
- [8086] NAIR S, LI W and KONG T. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 2007, 28(4):459-72.
- [8087] MASSO-WELCH PA, DARCY KM, STANGLE-CASTOR NC and IP MM. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2000, 5(2):165-85.
- [8088] CAYAMA E, TSUDA H, SARMA DS and FARBER E. Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature*, 1978, 275(5675):60-2.
- [8089] COHEN SM and ELLWEIN LB. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 1990, 249(4972):1007-11.
- [8090] ASAOKA Y, SAKAI H, HIRATA A, SADAHI J, GORYO M, MIYAMOTO Y, YANAI T, MASEGI T and OKADA K. Detection of initiation activity of 1,2-dimethylhydrazine in in vivo medium-term liver initiation assay system using 4-week-old rats without hepatocellular proliferative stimuli during the test chemical treatment period. *J. Vet. Med. Sci.*, 2010, 72(1):43-53.
- [8091] SUZUKI H, SHIROTORI T and HAYASHI M. A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004, 104(1-4):299-303.
- [8092] DULBECCO R, HENAHAN M and ARMSTRONG B. Cell types and morphogenesis in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1982, 79(23):7346-50.
- [8093] HVID H, THOTUP I, SJÖGREN I, OLEKSIEWICZ MB and JENSEN HE. Mammary gland proliferation in female rats: effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2012, 64(4):321-32.
- [8094] LEE JH, SUH OK and LEE MG. Pharmacokinetic changes in drugs during protein-calorie malnutrition: correlation between drug metabolism and hepatic microsomal cytochrome P450 isozymes. *Arch. Pharm. Res.*, 2004, 27(7):693-712.
- [8095] PETERS LP and TEEL RW. Effect of high sucrose diet on liver enzyme content and activity and aflatoxin B1-induced mutagenesis. *In Vivo.*, 2003, 17(2):205-10.

- [8096] AMMOUCHE A, DINH L, YOUYOU A, CLÉMENT M and BOURRE JM. Rate of alteration of hepatic mixed-function oxidase system in rats fed different dietary fats. *Biochem. Cell. Biol.*, 1993, 71(11-12):530-7.
- [8097] YOO JS, HONG JY, NING SM and YANG CS. Roles of dietary corn oil in the regulation of cytochromes P450 and glutathione S-transferases in rat liver. *J. Nutr.*, 1990, 120(12):1718-26.
- [8098] SANCHEZ V, LUTZ M. Dietary oils and antioxidant vitamins supplementation affect the fatty acid composition of liver microsomal phospholipids in the rat. *J. Nutr. Biochem.*, 1998, 9:155-163.
- [8099] WADE AE, WHITE RA, WALTON LC and BELLOWS JT. Dietary fat - A requirement for induction of mixed-function oxidase activities in starved-refed rats. *Biochem. Pharmacol.*, 1985, 15;34(20):3747-54.
- [8100] CHEN HW, LII CK, WU MH, OU CC and SHEENN LY. Amount and type of dietary lipid modulate rat hepatic cytochrome P-450 activity. *Nutr. Cancer*, 1997, 29(2):174-80.
- [8101] SOHN OS, SURACE A, FIALA ES, RICHIE JP, COLOMISO S, ZANG E and WEISBURGER JH. Effects of green and black tea on hepatic xenobiotic metabolizing systems in the male F344 rat. *Xenobiotica*, 1994, 24(2):119-27.
- [8102] CHEN L, BONDOC FY, LEE MJ, HUSSIN AH, THOMAS PE and YANG CS. Caffeine induces cytochrome P4501A2: induction of CYP1A2 by tea in rats. *Drug Metab. Dispos.*, 1996, 24(5):529-33.
- [8103] TASSANEYAKUL W, BIRKETT DJ, McMANUS ME, VERONESE ME, ANDERSON T, TUKEY RH and MINERS JO. Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem. Pharmacol.*, 1994, 18;47(10):1767-76.
- [8104] DENISON MS, SOSHILOV AA, HE G, DeGROOT DE and ZHAO B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.*, 2011, 124(1):1-22.
- [8105] NEBERT DW and KARP CL. Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AhR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AhR biology. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283(52):36061-5.
- [8106] KRAEMER SA, ARTHUR KA, DENISON MS, SMITH WL and DeWITT DL. Regulation of prostaglandin endoperoxidase H synthase-2 expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch Biochem Biophys.*, 1996, 330(2):319-28.
- [8107] CHOUDHARY D, JANSSON I, STOILOV I, SARFARAZI M and SCEHNKMAN JB. Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1. *Drug Metab. Dispos.*, 2004, 32(8):840-7.
- [8108] YAMAZAKI H and SHIMADA T. Effects of arachidonic acid, prostaglandins, retinol, retinoic acid and cholecalciferol on xenobiotic oxidations catalysed by human cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica.*, 1999, 29(3):231-41.
- [8109] VOGEL CF, SCIULLO E and MATSUMURA F. Activation of inflammatory mediators and potential role of ah-receptor ligands in foam cell formation. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2004, 4(4):363-73.
- [8110] SAVOURET JF, ANTENOS M, QUESNE M, XU J, MILGROM E and CASPER RF. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.*, 2001, 2;276(5):3054-9.
- [8111] SHIMBA S, WADA T and TEZUKA M. Arylhydrocarbon receptor (AhR) is involved in negative regulation of adipose differentiation in 3T3-L1 cells: AhR inhibits adipose differentiation independently of dioxin. *J. Cell. Sci.*, 2001, 114(Pt 15):2809-17.
- [8112] MA Q and BALDWIN KT. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *J. Biol. Chem.*, 2000 275(12):8432-8.
- [8113] SHAULIAN E and KARIN M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell. Biol.*, 2002, 4(5):E131-6.
- [8114] NEBREDA AR and PORRAS A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends. Biochem. Sci.*, 2000, 25(6):257-60.
- [8115] ZIPPER LM and MULCAHY RT. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol. Sci.*, 2003, 73(1):124-34.
- [8116] MISRA P, OWUOR ED, LI W, YU S, QI C, MEYER K, ZHU YJ, RAO MS, KONG AN and REDDY JK. Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(50):48745-54.
- [8117] HUANG HC, NGUYEN T and PICKETT CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(45):42769-74.
- [8118] BLOOM DA and JAISWAL AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and

- transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(45):44675-82.
- [8119] BHATTACHARYYA KK1, BRAKE PB, ELTOM SE, OTTO SA and JEFCOATE CR. Identification of a rat adrenal cytochrome P450 active in polycyclic hydrocarbon metabolism as rat CYP1B1. Demonstration of a unique tissue-specific pattern of hormonal and aryl hydrocarbon receptor-linked regulation. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(19):11595-602.
- [8120] TSUCHIYA Y, NAKAJIMA M, KYO S, KANAYA T, INOUE M and YOKOI T. Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res.*, 2004, 64(9):3119-25.
- [8121] De SOUSA ABREU R, PENALVA LO, MARCOTTE EM and VOGEL C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.*, 2009, 5(12):1512-26.
- [8122] SCHWANHÄUSSER B, BUSSE D, LI N, DITTMAR G, SSHUNSHHARDT J, WOLF J, CHEN W and SELBACH M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 2011, 473(7347):337-42.
- [8123] LUNDBERG E, FAGERBERG L, KLEVEBRING D, MATIC I, GEIGER T, COX J, ALGENÅS C, LUNDEBERG J, MANN M and UHLEN M. Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines. *Mol. Syst. Biol.*, 2010, 21:6:450.
- [8124] SHAROVA LV, SHAROV AA, NEDOREZOV T, PIAO Y, SJAIK N and KO MS. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.*, 2009, 16(1):45-58.
- [8125] VOGEL C, ABREU Rde S, KO D, LE SY, SHAPIRO BA, BURNS SC, SANDHU D, BOUTZ DR, MARCOTTE EM and PENALVA LO. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol. Syst. Biol.*, 2010, 24:6:400.
- [8126] MUKHERJI S, EBERT MS, ZHENG GX, TSANG JS, SHARP PA and VAN OUDENAARDEN A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat. Genet.*, 2011, 43(9):854-9.
- [8127] BAEK D, VOLLÉN J, SHIN C, CAMARGO FD, GYGI SP and BARTEL DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008, 455(7209):64-71.
- [8128] SELBACH M, SCHWANHÄUSSER B, THIERFELDER N, FANG Z, KHANIN R and RAJEWSKY N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 2008, 455(7209):58-63.
- [8129] JACOBS JM, ADKINS JN, QIAN WJ, LIU T, SHEN Y and CAMP DG 2nd, SMITH D. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J. Proteome Res.*, 2005, 4(4):1073-85.
- [8130] DAHAN O, GINGOLD H and PILPEL Y. Regulatory mechanisms and networks couple the different phases of gene expression. *Trends. Genet.*, 2011, 27(8):316-22.
- [8131] BUSHATI N and COHEN SM. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2007, 23:175-205.
- [8132] SHEHIN SE, STEPHENSON RO and GREENLEE WF. Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. Evidence for involvement of an aryl hydrocarbon receptor response element in constitutive expression. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(10):6770-6.
- [8133] ODA Y, NAKAJIMA M, MOHRI T, TAKAMIYA M, AOKI Y, FUKAMI T and YOKOI T. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012, 260(3):222-31.
- [8134] KOBAYASHI A, KANG MI, OKAWA H, OHTSUJI M, ZENKE Y, CHIBA T, IGARASHI K and YAMAMOTO M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.*, 2004, 24(16):7130-9.
- [8135] PURDOM-DICKINSON SE, SHEVELEVA EV, SUN H and CHEN QM. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Mol. Pharmacol.*, 2007, 72(4):1074-81.
- [8136] SHAY KP, MICHELS AJ, LI W, KONG AN and HAGEN TM. Cap-independent Nrf2 translation is part of a lipoic acid-stimulated detoxification stress response. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2012, 1823(6):1102-9.
- [8137] LI W, THAKOR N, XU EY, HUANG Y, CHEN C, YU R, HOLCIK M and KONG AN. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic. Acids. Res.*, 2010, 38(3):778-88.
- [8138] NARASIMHAN M, PATEL D, VEDPATHAK D, RATHINAM M, HENDERSON G and MAHIMAINATHAN L. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51111.
- [8139] OMIECINSKI CJ, VANDEN HEUVEL JP, PERDEW GH and PETERS JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.*, 2011, 120(1):S49-75.
- [8140] BÉLPOMME D, IRIGARAY P, HARDELL L, CLAPP R, MONTAGNIER L, EPSTEIN S and SASCO AJ. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ. Res.*, 2007, 105(3):414-29.

- [8141] IRIGARAY P, NEWBY JA, CLAPP R, HARDELL L, HOWARD V, MONTAGNIER L, EPSTEIN S and BELPOMME D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed. Pharmacother.*, 2007, 61(10):640-58.
- [8142] COHEN AJ. Air pollution and lung cancer: what more do we need to know? *Thorax*, 2003, 58(12):1010-2.
- [8143] HARRISON RM, LEUNG PL, SOMERVAILLE L, SMITH R and GILMAN E. Analysis of incidence of childhood cancer in the West Midlands of the United Kingdom in relation to proximity to main roads and petrol stations. *Occup. Environ. Med.*, 1999, 56(11):774-80.
- [8144] PERERA FP. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88(8):496-509.
- [8145] COHEN SM and ARNOLD LL. Chemical carcinogenesis. *Toxicol. Sci.*, 2011, 120(1):S76-92.
- [8146] WEIGELT B, PETERSEN JL and VAN'T VEER LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5(8):591-602.
- [8147] HODGSON E and ROSE RL. Metabolic interactions of agrochemicals in humans. *Pest. Manag. Sci.*, 2008, 64(6):617-21.
- [8148] WILLIAMS RT. Detoxification mechanisms: The metabolism and detoxification of drugs, toxic substances and other organic compounds. J. Wiley and Sons, New York, N.Y., 1959.
- [8149] CASTELL JV, DONATO MT and GÓMEZ-LECHÓN MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2005, 57(1):189-204.
- [8150] XU C, LI CY and KONG AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, 2005, 28(3):249-68.
- [8151] IRIGARAY P, MEJEAN L and LAURENT F. Behaviour of dioxin in pig adipocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 2005, 43(3):457-60.
- [8152] IRIGARAY P, NEWBY JA, LACOMME S and BELPOMME D. Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. *Biomed. Pharmacother.*, 2007, 61(10):665-78.
- [8153] HANKINSON O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, 433(2):379-86.
- [8154] MURRAY IA, REEN RK, LEATHERY N, RAMADOSS P, BONATI L, GONZALEZ FJ, PETERS JM and PERDEW GH. Evidence that ligand binding is a key determinant of Ah receptor-mediated transcriptional activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, 442(1):59-71.
- [8155] DERTINGER SD, NAZARENKO DA, SILVERSTONE AE and GASIEWICZ TA. Aryl hydrocarbon receptor signaling plays a significant role in mediating benzo[a]pyrene- and cigarette smoke condensate-induced cytogenetic damage in vivo. *Carcinogenesis*, 2001, 22(1):171-7.
- [8156] GIBSON GG, CINTI DL, SLIGAR SG and SCHENKMAN JB. The effect of microsomal fatty acids and other lipids on the spin state of partially purified cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255(5):1867-73.
- [8157] LUTZ M, BONILLA S, CONCHA J, ALVARADO J and BARRAZA P. Effect of dietary oils, cholesterol and antioxidant vitamin supplementation on liver microsomal fluidity and xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 1998, 42(6):350-9.
- [8158] STOHS SJ. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Free Radic. Biol. Med.*, 1990, 9(1):79-90.
- [8159] SAKAKI T and MUNETSUNA E. Enzyme systems for biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 88(1):23-30.
- [8160] MINIERO R, De FELIP E, FERRI F and di DOMENICO A. An overview of TCDD half-life in mammals and its correlation to body weight. *Chemosphere*, 2001, 43(4-7):839-44.
- [8161] NGUYEN T, YANG CS and PICKETT CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 37(4):433-41.
- [8162] TURPAEV KT. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, 78(2):111-26.
- [8163] KEUM YS and CHOI BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules*, 2014, 19(7):10074-89.
- [8164] HAYES JD and DINKOVA-KOSTOVA AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 2014, 39(4):199-218.
- [8165] YATES MS, TRAN QT, DOLAN PM, OOSBURN WO, SHIN S, McCULLOCH CC, SILKWORTH JB, TAGUCHI K, YAMAMOTO M, WILLIAMS CR, LIBY KT, SPOM MB, SUTTER TR and KENSLER TW. Genetic versus

- chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*, 2009, 30(6):1024-31.
- [8166] KWAK MK, WAKABAYASHI N, ITOH K, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M and KENSLER TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(10):8135-45.
- [8167] WAKABAYASHI N, SHIN S, SLOCUM SL, AGOSTON ES, WAKABAYASHI J, KWAK MK, MISRA V, BISWAL S, YAMAMOTO M and KENSLER TW. Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration. *Sci. Signal.*, 2010, 3(130):ra52.
- [8168] KENSLER TW and WAKABAYASHI N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*, 2010, 31(1):90-9.
- [8169] UEDA A, HAMADEH HK, WEBB HK, YAMAMOTO Y, SUEVOSHI T, AFSHARI CA, LEHMANN JM and NEGISHI M. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.*, 2002, 61(1):1-6.
- [8170] ASSEM M, SCHUETZ EG, LEGGAS M, SUN D, YASUDA K, REID G, ZELCER N, ADACHI M, STROM S, EVANS RM, MOORE DD, BORST P and SCHUETZ JD. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(21):22250-7.
- [8171] CHANG TK and WAXMAN DJ. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug Metab. Rev.*, 2006, 38(1-2):51-73.
- [8172] ZHANG J, HUANG W, CHUA SS, WEI P and MOORE DD. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science*, 2002, 298(5592):422-4.
- [8173] KLIEWER SA, MOORE JT, WADE L, STAUDINGER JL, WATSON MA, JONES SA, MCKEE DD, OLIVER BB, WILLSON TM, ZETTERSTRÖM RH, PERLMANN T and LEHMANN JM. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, 1998, 92(1):73-82.
- [8174] TIMSIT YE and NEGISHI M. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids*, 2007, 72(3):231-46.
- [8175] CHAMBON P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol. Endocrinol.*, 2005, 19(6):1418-28.
- [8176] TONTONOZ P, HU E, GRAVES RA, BUDAVARI AI and SPIEGELMAN BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.*, 1994, 8(10):1224-34.
- [8177] TONTONOZ P, HU E and SPIEGELMAN BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 1994, 79(7):1147-56.
- [8178] TUGWOOD JD, ISSEMANN I, ANDERSON RG, BUNDELL KR, MCPHEAT WL and GREEN S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.*, 1992, 11(2):433-9.
- [8179] PERAZA MA, BURDICK AD, MARIN HE, GONZALEZ FJ and PETERS JM. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicol. Sci.*, 2006, 90(2):269-95.
- [8180] CHEN C and KONG AN. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005, 26(6):318-26.
- [8181] AUSTOKER J. Diet and cancer. *BMJ*, 1994, 308(6944):1610-4.
- [8182] SPORN MB and LIBY KT. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2005, 2(10):518-25.
- [8183] CONNEY AH. Tailoring cancer chemoprevention regimens to the individual. *J. Cell. Biochem.*, 2004, 91(2):277-86.
- [8184] LIU J, SRIDHAR J and FOROOZESH M. Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships. *Molecules*, 2013, 18(12):14470-95.
- [8185] WANG JJ, ZHENG Y, SUN L, WANG L, YU PB, LI HL, TIAN XP, DONG JH, ZHANG L, XU J, SHI W and MA TY. CYP1A1 Ile462Val polymorphism and susceptibility to lung cancer: a meta-analysis based on 32 studies. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2011, 20(6):445-52.
- [8186] SUREKHA D, SAILAJA K, RAO DN, PADMA T, RAGHUNADHARAO D and VISHNUPRIVA S. Association of CYP1A1*2 polymorphisms with breast cancer risk: a case control study. *Indian J. Med. Sci.*, 2009, 63(1):13-20.
- [8187] KIM D and GUENGERICH FP. Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, 45:27-49.
- [8188] BRUNO RD and NJAR VC. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15(15):5047-60.

- [8189] SIEGEL D, BOLTON EM, BURR JA, LIEBLER DC and ROSS D. The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol.*, 1997, 52(2):300-5.
- [8190] CHAN TS, WILSON JX and O'BRIEN PJ. Coenzyme Q cytoprotective mechanisms. *Methods Enzymol.*, 2004, 382:89-104.
- [8191] RADOMINSKA-PANDYA A, BRATTON S and LITTLE JM. A historical overview of the heterologous expression of mammalian UDP-glucuronosyltransferase isoforms over the past twenty years. *Curr. Drug Metab.*, 2005, 6(2):141-60.
- [8192] KODAMA S and NEGISHI M. Sulfotransferase genes: regulation by nuclear receptors in response to xeno/endobiotics. *Drug Metab. Rev.*, 2013, 45(4):441-9.
- [8193] HARRIS TR and HAMMOCK BD. Soluble epoxide hydrolase: Gene structure, expression and deletion. *Gene*, 2013, 526:61-74.
- [8194] DIPPLE A. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci. Publ.*, 1994, (125):107-29.
- [8195] WOLFE AR, SMITH TJ and MEEHAN T. Benzo[a]pyrene diol epoxide forms covalent adducts with deoxycytidylic acid by alkylation at both exocyclic amino N(4) and ring imino N-3 positions. *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, 17(4):476-91.
- [8196] MELENDEZ-COLON VJ, LUCH A, SEIDEL A and BAIRD WM. Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13(1):10-7.
- [8197] ZHANG L, JIN Y, HUANG M and PENNING TM. The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: Interconversion of PAH catechols and PAH o-Quinones. *Front. Pharmacol.*, 2012, 16:3:193.
- [8198] CHAKRAVARTI D, PELLING JC, CAVALIERI EL and ROGAN EG. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92(22):10422-6.
- [8199] TODOROVIC R, ARIESE F, DEVANESAN P, JANKOWIAK R, SMALLL GJ, ROGAN E and CAVALIERI E. Determination of benzo[a]pyrene- and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in rat mammary glands. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, 10(9):941-7.
- [8200] FUSS JO and COOPER PK. DNA repair: dynamic defenders against cancer and aging. *PLoS Biol.*, 2006, 4(6):e203.
- [8201] HSIEH P and YAMANE K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, 129(7-8):391-407.
- [8202] DUNCAN RE, EL-SOHEMY A and ARCHER MC. Delivery of mevalonate to murine extrahepatic tissues via mini-osmotic pumps. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2004, 50(2):139-43.
- [8203] REINHARDT TA and LIPPOLIS JD. Mammary gland involution is associated with rapid down regulation of major mammary Ca²⁺-ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, 378(1):99-102.
- [8204] HENGSTLER JG, VAN DER BURG B, STEINBERG P, OESCH F. Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metab. Rev.*, 1999, 31(4):917-70.



ANEXOS

Ontogeny of the Major Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Expression and the Dietary Lipids Modulatory Effect in the Rat Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Breast Cancer Model

Miguel Ángel Manzanares, Montserrat Solanas, Raquel Moral, Raquel Escrich, Elena Vela, and Eduard Escrich

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; E-mail: Eduard.Esrich@uab.es

Received 14 May 2014; revised 1 July 2014; accepted 10 July 2014

ABSTRACT: Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide. Environmental factors such as xenobiotic exposure and lifestyle and nutrition play a key role in its etiology. This study was designed to evaluate the age-related changes in the expression of major xenobiotic-metabolizing enzymes (XMEs) in the rat liver and the mammary gland in the dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer model. The influence of dietary lipids on the ontogeny of XMEs was also evaluated. mRNA and protein levels of phase I (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1) and phase II (NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 and GSTP1) enzymes were analyzed, as well as their regulation by AhR and Nrf2, respectively. Results showed differences in the phase I enzymes expression, whereas little changes were obtained in phase II. High corn oil and olive oil diets differentially influenced the expression of age-related changes, suggesting that the different susceptibility to xenobiotic exposure depending upon the age may be modulated by dietary factors. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. *J. Biochem. Mol. Toxicol*

00:1–10, 2014; View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI 10.1002/jbt.21596

KEYWORDS: Ontogeny; Xenobiotic-Metabolizing Enzymes (XMEs); Breast Cancer Model; Dietary Lipids; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the most important causes of women death in high-income countries. The rates increase in parallel with industrialization, growing rapidly in middle- and low-income countries [1, 2]. These data highlight the fact that, in general, physical environmental factors, such as air pollution, water contaminant or ionizing radiation, and lifestyle including food and nutrition changing, sedentary and tobacco usage, could increase the risk of cancer [2, 3].

It is well known that xenobiotic exposure is an important risk factor in cancer promotion and/or initiation. Much has been described about the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), a group of environmental contaminants originated from the incomplete combustion of organic compounds, and their carcinogenic effects [4–6]. The PAH metabolism is divided into two phases and implies a big group of xenobiotic-metabolizing enzymes (XMEs). During phase I, the original lipophilic compound is first oxidized by the cytochrome P450 (CYP) family 1 (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1) and activated until its most reactive metabolites, which can interact with DNA and induce gene mutations. These reactive compounds could be modified and/or conjugated with glutathione, sulfate, glycine, or glucuronic acid

Correspondence to: Eduard Escrich.

Contract grant sponsor: Plan Nacional de I+D+I 2004–2007.

Contract grant number: AGL2006-07691.

Contract grant sponsor: Plan Nacional de I+D+I 2007–2011.

Contract grant number: AGL2011-24778.

Contract grant sponsor: Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008–2012.

Contract grant number: FPCO2008-165.396.

Contract grant sponsor: Agencia para el Aceite de Oliva, Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino 2008–2012.

Contract grant number: AAO2008-165.471.

Contract grant sponsor: Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Española 2009–2013.

Contract grant number: OIP2009-165.646.

Miguel Ángel Manzanares and Montserrat Solanas contributed equally to this work.

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

by a wide range of phase II enzymes until their more hydrophilic and inactive compounds, which can be more easily excreted. Glutathione-S-transferase (GST), UDP-glucuronosyltransferases, sulfotransferases, and NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1) are some of the phase II enzymes involved [6–8]. The XMEs expression is mainly regulated by the activation of two different transcription factors, AhR for the phase I enzymes and the Nrf2 for the phase II enzymes [9–12].

The ontogeny of the XMEs has attracted much attention due to their importance in age-related changes by metabolizing the environmental chemicals that may induce the risk of cancer at the different stages of life [13]. However, data, especially in humans, are limited. The ontogeny of hepatic CYPs enzymes has been largely studied but little is known about their expression changes in extrahepatic tissues as well as those in the phase II enzymes [14–21].

A wide variety of dietary compounds have been described to modulate the XMEs. This kind of metabolism modifiers could vary from macronutrient, as lipids or proteins, until microcomponents, including vitamins, minerals, and phytochemicals, as coumarins, lignans, or polyphenols [22–28].

The breast cancer model induced in the Sprague–Dawley rat by the PAH dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) is one of the most useful models in breast cancer research [29, 30]. In this model, we have extensively demonstrated the differential modulating effects of high corn oil (HCO) and virgin olive oil diets and some of the molecular mechanisms underlying these effects [31]. Nonetheless, little is known about the mechanisms responsible for DMBA effectiveness and tissue specificity.

The aim of this study was to analyze the expression pattern of major phase I and phase II enzymes involved in the DMBA metabolism, both in the liver, the main metabolizing organ, and the mammary gland, the carcinogen target tissue, in different stages of the rat postnatal development to gain insight into the determinants of the different susceptibility of the mammary gland to the DMBA exposure. Rats just after weaning (PND24), pubertal (PND36), young postpubertal (PND51), and adult were analyzed. To determine the influence that dietary lipids may have in the age-depending changes, low fat (LF), HCO, and high extra virgin olive oil (HOO) diets were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Biological samples were obtained previously from 57 female Sprague–Dawley rats [32]. Animals were purchased from Crl:OFA (Lyon, France) on postnatal

day (PND) 23 and maintained under standard conditions. The day after arrival (PND24), six rats were sacrificed, and the remaining ones were fed different diets: an LF diet (3% corn oil) (group LF, $n = 17$), HCO diet (20% corn oil) (group HCO, $n = 17$), and a high extra virgin olive oil (HOO) diet (3% corn oil and 17% extra virgin olive oil) (group HOO, $n = 17$). The definition, preparation, and suitability of the experimental diets were previously described [32–35]. Mammary cancer was induced with a 5 mg single dose of DMBA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) at 53 days of age. At PND36 ($n = 6$ per group), PND51 ($n = 6$ per group), and PND100 ($n = 5$ per group), rats were euthanized. At necropsy, livers and mammary glands were washed with physiological serum, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for molecular analyses.

RNA Extraction, Reverse Transcription, and Real-Time PCR

Total RNA was isolated from the liver using the RNeasy[®] Mini kit (QiaGen, Hilden, Germany) and the RNeasy[®] Lipid Tissue Mini kid (QiaGen) for mammary glands, according to manufacturer's instructions. RNA was quantified by using a NanoDrop1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The synthesis of cDNA was performed according to the High-Capacity cDNA Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 25°C , 120 min at 37°C , and 5 sec at 85°C . Real-time PCR was carried out in accordance with the TaqMan[®] Gene Expression Assay (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), according to manufacturer's conditions. Specific Gene TaqMan Assay used were Cyp1a1 (Rn00487218_m1), Cyp1a2 (Rn00561082_m1), Cyp1b1 (Rn00564055_m1), Nqo1 (Rn00566528_m1), Gstp1 (Rn00561378_gH), AhR (Rn00565750_m1), Nrf2 (Rn00477784_m1), and Hprt (Rn01527840_m1) as the housekeeping control gene. PCR reactions were performed in duplicate for each sample in a MyiQ Cyclor (BioRad Laboratories, Hercules, CA) under the following conditions: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 60 sec at 60°C . Cycle thresholds (Ct) for each sample were obtained and the relative expression of each gene was calculated comparing with the house keeping control gene Ct values ($2^{-\Delta\text{Ct}}$).

Protein Extraction

Liver and mammary gland tissue were homogenized in 20 mM Tris–HCl pH 7.4 and 250 mM

sucrose and centrifuged at 10,000g for 20 min at 4°C. Supernatant was collected and ultracentrifuged at 105,000g for 1 h at 4°C. Supernatant was stored at –80°C as the cytosolic fraction and the pellet resuspended in 100 mM NaHPO₄, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 1 mM dithiothreitol, and ultracentrifuged at 105,000g for 1 h at 4°C. The pellet was stored at –80°C as the microsomal fraction. The purity of fractions was checked by immunodetection with lactate dehydrogenase (LDH) and cytochrome P450 reductase (CPR) antibodies, respectively. For total tissue lysate, the liver was homogenized by sonication according to the method of Dudley et al. [36] with some modifications. Briefly, frozen tissues were sonicated in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA Buffer) (0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, and 1% Nonidet P-40) with 10 µg/mL leupeptin and 20 µg/mL aprotinin for 15 sec, and then 100 µM of phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) was added. Samples were again sonicated and the final extract was diluted in RIPA buffer with protease inhibitors and stored at –80°C. All procedures were carried out at 0–4°C. The protein concentration was measured by the Lowry assay (Bio-Rad Laboratories).

Western Blot Analysis

The protein expression was measured using subcellular or total extracts. Samples were resolved by 8–12% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. Primary antibodies used were CPR (1:2000), LDH (1:2000), NQO1 (1:3000), and Nrf2 (1:2000) from Abcam (Cambridge, UK); glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (1:1000) and CYP1A2 (1:2000) from Millipore (Billerica, MA); CYP1A1 (1:500), CYP1B1 (1:1000), and AhR (1:10 000) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); and GST from (1:2000) Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). Horseradish peroxidase conjugated rabbit, mouse, and goat secondary antibodies were obtained from Sigma–Aldrich. Immunoreactive proteins were visualized using the Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore Corporation). Densitometric values of bands were normalized to the mean value of three replicates of a control sample extract and then to micrograms of protein loaded.

Immunoprecipitation

Liver cytosolic extracts were immunoprecipitated with pure Proteome™ ProteinG magnetic beads (Millipore). Briefly, 50 µL of magnetic beads were washed with 500 µL PBS-Tween 0.1% and then 100 µL of the antibody solution (AhR, 1:100, or Nrf2, 1:500) (Abcam) was added. A shaking incubation was carried out for

20 min at room temperature. Conjugated antibody beads were incubated overnight at 4°C with 200 µL of the protein extract dilution at a concentration of 2 µg/µL. Later, beads were heated for 10 min at 90°C in 50 µL Laemli Buffer 1× (Bio-Rad Laboratories) containing 5% 2-mercaptoethanol and, finally, 20 µL of the solution was analyzed by the Western Blot using Hsp90 (1:2000) (Abcam) or Keap1 (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology) for the AhR- or Nrf2-immunoprecipitated samples, respectively.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (20.0 Version). The distribution of each variable was determined by the Kolmogorov–Smirnov test, and the equality of variances among groups was determined by Leven's test. Quantitative data were analyzed by the nonparametric Mann–Whitney's *U*-test and qualitative data by Pearson's chi-squared test. Correlations were carried out through Kendall's Tau-b and Spearman's rho tests. The level of significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Tissue Specificity of the XMEs mRNA Expression Pattern

As shown in Table 1, in all time points studied and for all dietary treatments, in the liver, CYP1A2 was the highest expressed phase I enzyme, followed by CYP1A1, whose expression was 100-fold lower, and CYP1B1, with mRNA levels 1.4- to 27-fold lower than those of CYP1A1. All the differences were statistically significant except when comparing the CYP1A1 and CYP1B1 mRNA levels at PND51 in the LF group.

In the mammary gland, CYP1A2 mRNA was not detected. In contrast, CYP1B1 was the most expressed enzyme, followed by CYP1A1 whose mRNA levels were 2- to 80-fold lower, all the differences being statistically significant except at PND36 in the HCO group (Table 1).

When comparing the CYP1s mRNA expression between tissues, the CYP1A1 levels were 80-fold higher in the liver than in the mammary gland at PND24 ($P < 0.05$). This difference was gradually reduced all through the time so that at PND36 the CYP1A1 expression was only 1.5- to 4-fold higher in the liver, significantly in the LF and HOO groups. Lower differences were found at PND51 and PND100 ($P < 0.05$ in the LF and HCO groups at PND100). As for CYP1B1, the mRNA levels were 5- to 70-fold higher in the mammary gland than in the liver, all differences being statistically significant (Table 1).

TABLE 1. Expression Pattern of Phase I and Phase II XMEs in the Liver and in the Mammary Gland in the Rat DMBA-Induced Breast Cancer Model: Effects of the Age and Dietary Lipids

PND/Group	Liver												Mammary Gland											
	CYP1A2		CYP1A1		CYP1B1		GSTP1		NQO1		CYP1A1		CYP1B1		GSTP1		NQO1							
	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.	mRNA	Prot.						
24	M ± SD	27.03 ± 15.6	133.02 ± 20.2	0.34 ± 0.67	459.60 ± 154.2	0.013 ± 0.004	342.31 ± 73.62	6.36 ± 9.73	22.70 ± 7.71	3.01 ± 1.71	7.28 ± 7.44	0.006 ± 0.011	0.064 ± 0.032	1.03 ± 0.22	21.90 ± 16.76	0.540 ± 0.120	186.59 ± 111.27							
	m	20.04	135.5	0.073	428.68	0.012	350.5	1.522	23.47	2.49	4.55	0.001	0.069	0.032	21.32	0.549	152.3							
	5th-95th percentile	14.52-50.06	106.11-154.08	0.06-1.32	325.19-674.90	0.009-0.018	252.43-422.77	4.45-21.07	12.53-31.45	1.53-5.49	0.99-17.71	0.000-0.021	0.025-0.101	0.81-1.26	3.63-41.64	0.386-0.660	73.66-335.96							
36	LF	M ± SD	48.16 ± 23.23	147.92 ± 29.52	0.18 ± 0.17	110.41 ± 78.23	0.006 ± 0.002	145.07 ± 103.48	2.07 ± 2.35	36.62 ± 10.96	6.51 ± 5.77	3.43 ± 1.70	0.034 ± 0.028	0.087 ± 0.026	1.15 ± 0.20	22.66 ± 11.20	0.569 ± 0.135	82.98 ± 61.17						
	m	42.64	134.4	0.115	78.64	0.006	159.9	0.865	32.32	4.14	3.12	0.027	0.081	1.146	25.31	0.581	76.3							
	5th-95th percentile	23.08-80.04	121.36-189.18	0.03-0.39	52.02-227.42	0.004-0.009	28.58-253.10	0.27-5.20	27.76-52.78	1.73-13.94	1.62-5.76	0.005-0.070	0.057-0.121	0.92-1.41	7.69-33.47	0.401-0.707	21.82-153.91							
	HCO	M ± SD	46.92 ± 19.49	124.80 ± 25.92	0.21 ± 0.16	102.59 ± 55.74	0.006 ± 0.001	218.77 ± 75.15	1.49 ± 1.22	49.36 ± 7.70	3.58 ± 2.09	4.44 ± 1.96	0.056 ± 0.022	0.108 ± 0.049	0.72 ± 0.18	16.17 ± 11.12	0.563 ± 0.179	76.92 ± 42.45						
	m	48.70	126.6	0.180	103.69	0.007	249.8	1.209	46.99	3.28	4.82	0.057	0.118	0.756	17.58	0.585	86.7							
	5th-95th percentile	22.70-69.96	89.24-151.59	0.03-0.41	37.18-170.42	0.005-0.008	108.29-258.69	0.48-3.25	42.45-60.52	1.51-6.23	2.02-6.63	0.030-0.079	0.050-0.157	0.48-0.88	2.71-29.84	0.350-0.747	26.07-125.48							
	HCO	M ± SD	44.77 ± 10.20	117.07 ± 21.14	0.071 ± 0.011	50.96 ± 18.29	0.008 ± 0.004	210.19 ± 173.19	3.38 ± 3.19	31.67 ± 11.77	3.51 ± 1.68	1.47 ± 0.84	0.045 ± 0.022	0.162 ± 0.123	0.99 ± 0.16	40.59 ± 25.23	0.517 ± 0.095	61.28 ± 58.66						
	m	42.76	114.1	0.068	41.58	0.007	258.2	2.398	30.53	3.38	1.33	0.044	0.108	1.030	48.19	0.510	51.8							
	5th-95th percentile	34.29-58.11	95.89-145.70	0.06-0.09	36.63-76.78	0.005-0.015	1.34-393.71	0.54-7.71	17.19-45.05	1.72-5.54	0.57-2.62	0.022-0.073	0.067-0.343	0.77-1.15	7.94-64.73	0.428-0.650	10.087-144.67							
51	LF	M ± SD	24.86 ± 4.63	140.14 ± 20.45	0.013 ± 0.019	17.91 ± 3.62	0.005 ± 0.003	190.60 ± 130.83	0.89 ± 0.31	22.66 ± 8.91	4.17 ± 2.32	1.97 ± 1.10	0.008 ± 0.013	0.112 ± 0.075	1.00 ± 0.24	18.25 ± 23.68	0.451 ± 0.087	119.48 ± 52.56						
	m	22.92	142.4	0.007	18.55	0.005	220.6	0.925	26.58	3.81	1.74	0.003	0.127	0.924	6.35	0.448	135.8							
	5th-95th percentile	20.61-31.36	116.10-165.44	0.002-0.041	13.73-22.34	0.003-0.009	38.15-344.32	0.48-1.26	10.95-31.21	2.08-7.32	1.07-3.57	0.000-0.028	0.022-0.199	0.77-1.30	0.001-49.76	0.361-0.570	43.64-168.108							
	HCO	M ± SD	43.24 ± 8.28	135.70 ± 17.52	0.023 ± 0.023	27.88 ± 16.82	0.004 ± 0.001	204.57 ± 129.07	1.27 ± 1.34	27.61 ± 5.87	1.70 ± 1.14	2.20 ± 1.26	0.022 ± 0.012	0.136 ± 0.051	1.20 ± 0.37	21.20 ± 19.24	0.495 ± 0.184	101.51 ± 116.19						
	m	41.51	137.5	0.014	22.29	0.004	179.8	0.745	29.32	1.25	1.50	0.023	0.132	1.154	20.80	0.502	57.3							
	5th-95th percentile	34.92-54.84	112.44-156.00	0.011-0.056	12.17-51.15	0.004-0.006	83.70-386.77	0.40-3.26	20.41-33.64	0.87-3.40	1.24-3.85	0.009-0.038	0.081-0.206	0.80-1.63	0.307-44.18	0.257-0.701	5.71-271.53							
	HCO	M ± SD	34.15 ± 6.63	121.92 ± 8.77	0.009 ± 0.006	25.24 ± 11.87	0.004 ± 0.002	257.20 ± 117.58	0.84 ± 0.72	20.10 ± 12.41	2.41 ± 1.18	3.03 ± 1.76	0.005 ± 0.002	0.152 ± 0.120	0.92 ± 0.30	20.87 ± 8.11	0.448 ± 0.188	151.65 ± 94.96						
	m	34.14	123.8	0.007	25.19	0.004	269.0	0.576	19.68	2.30	2.99	0.005	0.124	1.010	20.27	0.519	155.2							
	5th-95th percentile	26.96-41.73	110.55-130.92	0.004-0.017	11.96-38.25	0.002-0.006	117.73-396.40	0.40-1.91	5.53-33.53	1.07-3.83	1.18-5.23	0.002-0.007	0.041-0.305	0.51-1.20	12.85-32.05	0.179-0.616	26.27-253.82							
100	LF	M ± SD	28.30 ± 7.01	105.46 ± 9.46	0.009 ± 0.003	26.18 ± 11.79	0.002 ± 0.001	161.77 ± 193.60	0.57 ± 0.13	32.01 ± 11.68	2.21 ± 0.85	50.80 ± 28.83	0.001 ± 0.0005	0.126 ± 0.069	0.95 ± 0.26	29.67 ± 42.51	0.550 ± 0.114	531.23 ± 168.53						
	m	25.75	106.8	0.008	26.61	0.002	120.3	0.535	33.89	1.91	40.92	0.001	0.089	0.994	8.77	0.518	471.2							
	5th-95th percentile	20.94-36.01	93.39-115.04	0.006-0.013	11.69-39.82	0.001-0.003	13.46-423.32	0.44-0.74	17.01-42.82	1.37-3.29	29.13-90.16	0.001-0.003	0.075-0.220	0.65-1.21	1.22-88.31	0.427-0.690	348.16-710.88							
	HCO	M ± SD	61.50 ± 21.38	104.58 ± 7.15	0.025 ± 0.030	58.65 ± 53.70	0.002 ± 0.001	80.38 ± 107.28	0.70 ± 0.16	59.71 ± 11.57	2.39 ± 0.81	45.25 ± 11.12	0.006 ± 0.003	0.062 ± 0.024	0.92 ± 0.26	25.06 ± 30.88	0.561 ± 0.147	380.38 ± 189.77						
	m	57.48	103.5	0.016	36.53	0.002	19.7	0.625	43.47	2.11	40.37	0.004	0.057	0.882	17.13	0.536	430.5							
	5th-95th percentile	38.99-86.83	97.45-113.65	0.006-0.066	22.72-132.65	0.002-0.003	2.66-224.77	0.55-0.92	24.08-48.08	1.78-3.49	34.48-57.31	0.004-0.011	0.039-0.093	0.68-1.26	0.91-66.91	0.398-0.719	164.93-560.68							
	HCO	M ± SD	31.34 ± 8.45	118.06 ± 11.52	0.010 ± 0.006	22.33 ± 8.50	0.002 ± 0.001	115.84 ± 96.12	0.98 ± 0.23	40.74 ± 4.96	2.57 ± 1.09	64.83 ± 28.90	0.016 ± 0.014	0.140 ± 0.111	1.21 ± 0.06	27.36 ± 26.33	0.586 ± 0.263	489.73 ± 154.48						
	m	32.76	116.5	0.011	21.83	0.002	85.4	0.912	41.42	2.34	64.95	0.011	0.105	1.180	23.70	0.480	445.8							
	5th-95th percentile	21.47-41.02	107.69-133.22	0.004-0.016	12.82-32.52	0.001-0.003	34.17-242.52	0.72-1.26	34.08-44.58	1.43-3.94	36.04-101.56	0.003-0.034	0.066-0.291	1.15-1.28	5.12-62.45	0.447-0.941	348.80-694.78							

Abbreviations: PND, postnatal day; LF, low-fat diet group; HCO, high corn oil diet group; HOO, high extra virgin olive oil diet group; n, sample size; M, mean; SD, standard deviation; m, median. The 5th and 95th percentiles are shown below the corresponding median values.

Fewer differences were detected in the mRNA expression of the phase II enzymes. In the liver, NQO1 was the main enzyme, with levels three- to fourfold higher than those of GSTP1, all differences being significant except at PND36 in the HOO group and at PND51 in the HCO group. On the contrary, in the mammary gland, the most expressed phase II enzyme was GSTP1, whose expression was one- to twofold higher than that of NQO1 ($P < 0.05$ in all cases except at PND36 in the HCO group) (Table 1).

When comparing the phase II XMEs expression between tissues, few differences were found in GSTP1 and the statistical significance was only reached at PND100 in the LF group. Regarding NQO1, it was two- to eightfold more expressed in the liver compared to the mammary gland, all the differences being statistically significant (Table 1).

Age-Dependent Changes in the XMEs Expression Pattern in the Liver

Results showed an overall decrease in the CYP1A1 and CYP1B1 expression, both at mRNA and protein levels, from PND24, just after weaning, until PND100. An increase in the CYP1A1 mRNA levels was observed at PND36 in comparison with PND24 in the LF and HCO groups, but it was not significant and did not match with a parallel increase in protein levels. The CYP1A2 expression did not show a clear pattern over time as the other CYPs. Thus, although the mRNA levels also displayed a nonsignificant tendency to increase at PND36, they returned to the lower previous values (LF group) or remained slightly increased in comparison with the previous PND24 values (HCO and HOO groups). Moreover, at protein level, CYP1A2 showed a decrease at PND100, significantly in the LF and HCO groups (Figure 1A and 1B).

The downregulation of the CYP1A1 and CYP1B1 expression along the time was accompanied by a significant increase in the AhR cytoplasmic retention at PND100 in all experimental groups. However, the AhR protein levels increased at PND51 and PND100, and the mRNA levels remained the same (HCO and HOO groups) or decreased at PND100 (LF group) (Figure 1C).

The differences in the expression of the phase II XMEs at mRNA level over time were, in general, less prominent than those of the phase I enzymes, and only the comparison between the NQO1 mRNA levels at PND36 and PND51 in the HCO group was statistically significant. In general, mRNA levels tend to decrease over time, especially for GSTP1 (Figure 2A). In contrast, at a protein level, both GSTP1 and NQO1 showed a significant increase, but while it occurred noticeably

at PND100 for NQO1, in the case of GSTP1 it was more gradual and occurred at PND36 and PND100 (Figure 2B).

When analyzing the role of Nrf2 in the changes observed in the phase II XMEs expression with the age, the results revealed significantly higher cytoplasmic retention and lower protein levels in the LF and HCO groups, but not in the HOO group. This was compatible with the trend to a decrease in the phase II enzymes mRNA levels. In contrast, the Nrf2 mRNA levels increased after PND24 in all experimental groups (Figure 2C).

To clarify the overall effect of age on the liver XMEs expression, a ratio between the mRNA levels of phase I and II enzymes was calculated (Figure 3A). This ratio increased along the time in the LF and, especially, HCO groups, and at PND100 in the LF group. On the contrary, it remained unchanged in the HOO group.

Age-Dependent Changes in the XMEs Expression Pattern in the Mammary Gland

A significant increase in the CYP1A1 mRNA levels at PND36 followed by a decrease in values similar to the earliest ones was detected in the mammary gland in all experimental groups. The CYP1B1 mRNA expression showed a similar behavior but less prominent, reaching the highest levels at PND51 and the statistical significance only in the HOO group (Figure 1D).

Regarding the phase II enzymes, their mRNA levels remained almost the same with age in any experimental group (Figure 2D). GSTP1 protein levels neither differed significantly among the several time points analyzed. On the contrary, those of the NQO1 significantly increased at PND100 in all groups, similarly to that occurred in the liver (Figure 2E).

The analysis of the ratio between the mRNA expression of phase I and phase II XMEs in the mammary gland showed an increase at PND36 compared with PND24, without significant changes in the LF and HOO groups. In the HCO group, the increase of this ratio at PND36 was higher and then it significantly decreased (Figure 3B).

DISCUSSION

Under our knowledge, this is the first work comparing the ontogeny of major XMEs involved in DMBA metabolism in the rat liver and mammary gland. Our results showed that CYP1A2 is the most expressed hepatic phase I XME. It was only detected in this tissue, and its mRNA and protein levels remained almost the same depending upon the age. The CYP1A1 and CYP1B1

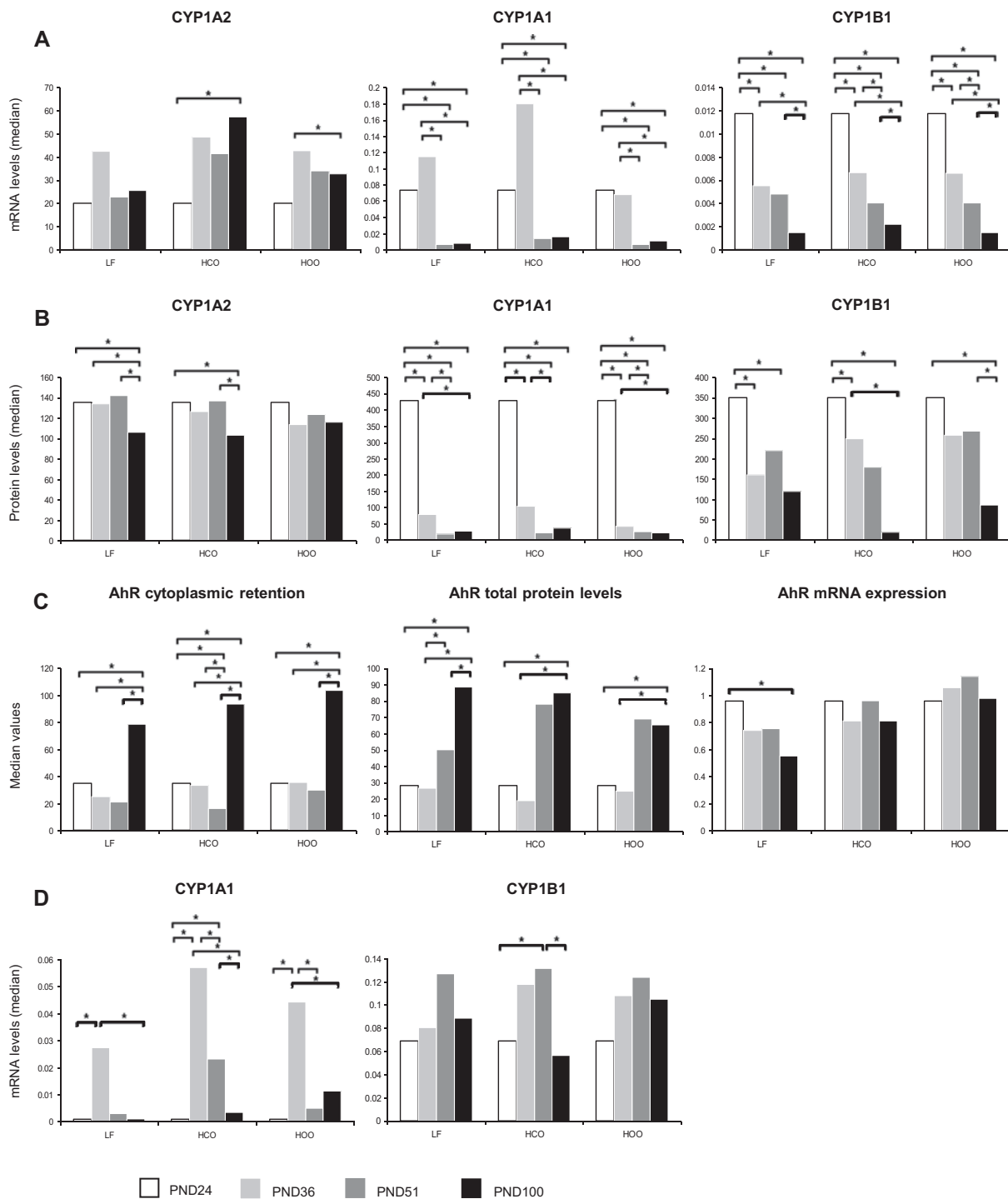


FIGURE 1. Effect of the age on the phase I XMEs expression in the rat DMBA-induced breast cancer model. Animals were fed a LF, HCO, or high extra virgin olive oil (HOO) diet. Median values for each group at the different ages are shown (24, 36, 51, and 100 PNDs) are shown. (A) Relative mRNA expression of CYP1A2, CYP1A1, and CYP1B1 in the liver. (B) Protein levels of the CYP1A2, CYP1A1, and CYP1B1 in the liver. (C) Role of AhR in the age-dependent changes of the hepatic phase I enzymes expression. From left to right: measurement of the AhR cytoplasmic retention by AhR immunoprecipitation and Hsp90 immunodetection; AhR protein levels in total tissue lysates; and relative AhR mRNA expression. (D) Relative mRNA expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the mammary gland. * $P < 0.05$, nonparametric Mann-Whitney U -test.

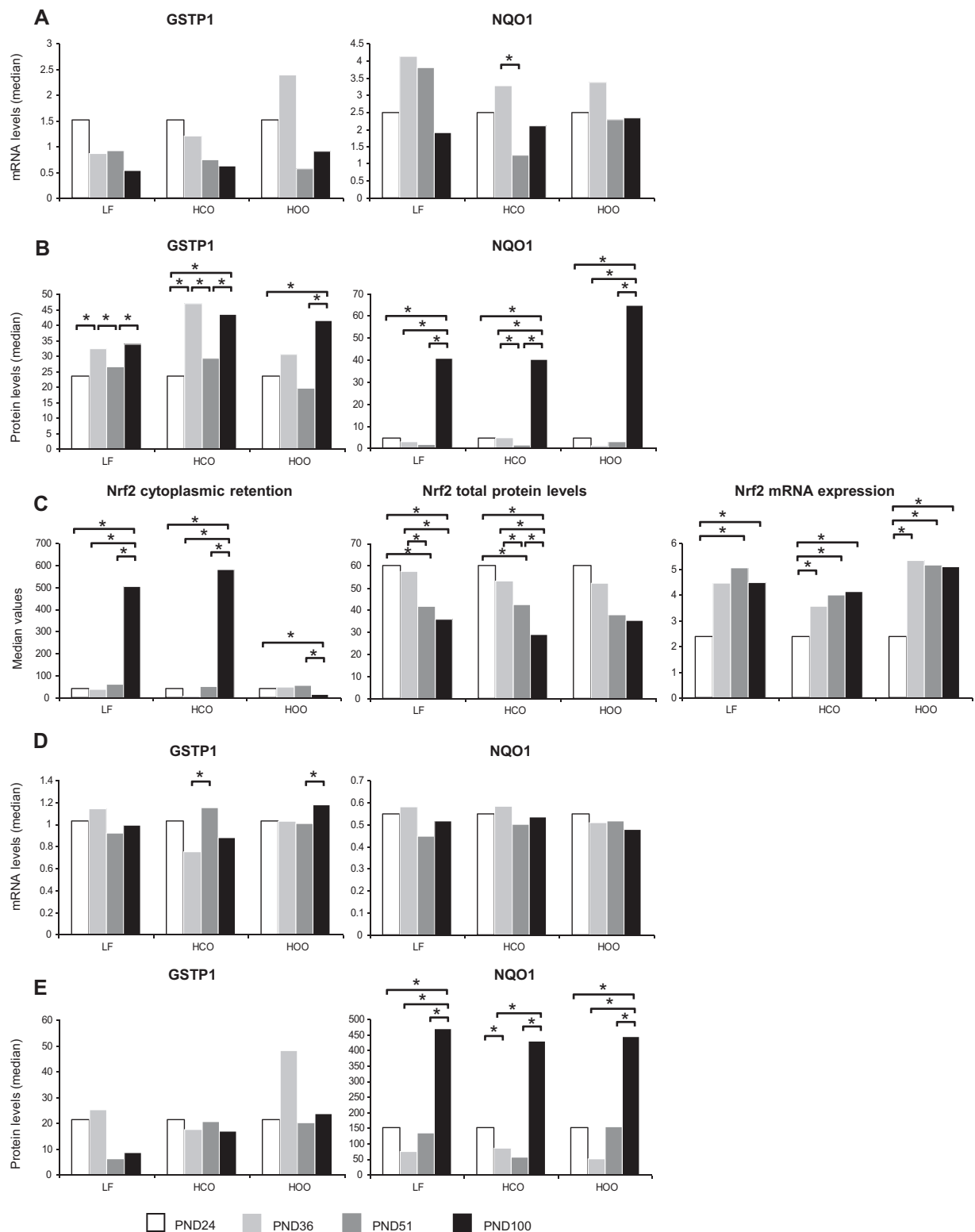


FIGURE 2. Effect of age on the phase II XMEs expression in the rat DMBA-induced breast cancer model. Animals were fed a LF, HCO, or high extra-virgin olive oil (HOO) diet. Median values for each group at the different ages (24, 36, 51, and 100 PNDs) are shown. (A) Relative mRNA expression of GSTP1 and NQO1 in the liver. (B) Protein levels of the GSTP1 and NQO1 in the liver. (C) Role of Nrf2 in the age-dependent changes of the hepatic phase II enzymes expression. From left to right: measurement of the Nrf2 cytoplasmic retention by Nrf2 immunoprecipitation and Keap1 immunodetection; Nrf2 protein levels in total tissue lysates; and relative Nrf2 mRNA expression. (D) Relative mRNA expression of GSTP1 and NQO1 in the mammary gland. (E) Protein levels of GSTP1 and NQO1 in the mammary gland. * $P < 0.05$, nonparametric Mann–Whitney U -test.

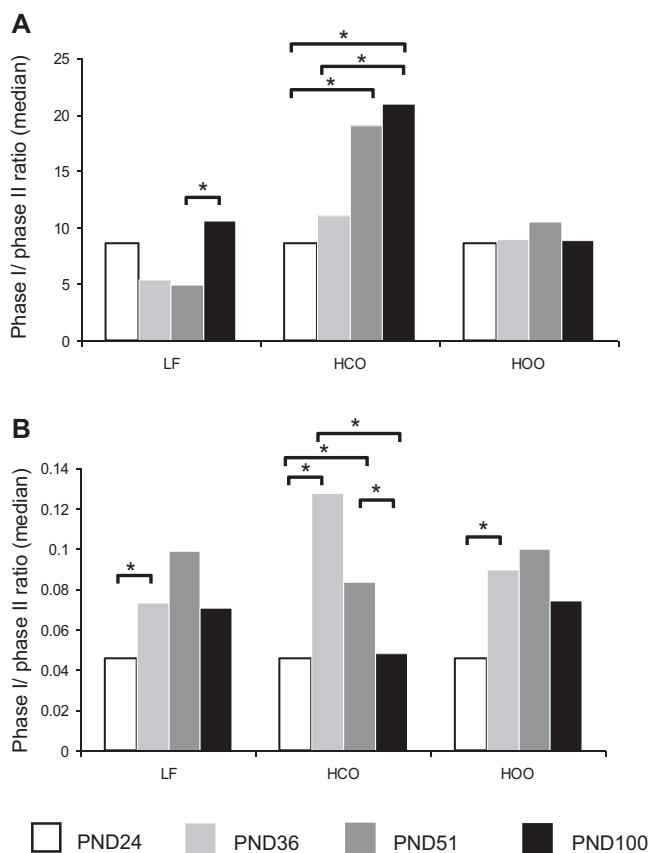


FIGURE 3. Ratio between the relative mRNA expression of the phase I and phase II XMEs in the liver and in the mammary gland in the rat DMBA-induced breast cancer model. For each animal, a summation of the individual relative expression data for each enzyme for both phases I and II was made and the division between them was calculated. With the single ratio results, the median values for each experimental group were obtained. (A) Effect of the age for each dietary treatment in the liver. (B) Effect of the age for each dietary treatment in the mammary gland. * $P < 0.05$, nonparametric Mann-Whitney U -test. PND, postnatal day; LF, low-fat diet group; HCO, high corn oil diet group; HOO, high extra virgin olive oil diet group.

expressions were substantially lower, and a general decrease in their mRNA and protein levels was observed from PND24 onwards. In the mammary gland, CYP1B1 was the main expressed enzyme and mRNA levels tended to increase at PND51 in all groups, significantly in the HCO group. This expression pattern could be associated with the sexual maturity and the CYP1B1 activity in the estrogen metabolism [8, 37]. Moreover, it could be related to the greater susceptibility due to the xenobiotics exposure the mammary gland displays around this age in the rat DMBA-induced breast cancer model [29], as well as to the tumor-enhancing effect of HCO diets [31]. As for CYP1A1, its mRNA levels also decreased after PND36, as in the liver.

This CYP1 tissue-specific expression pattern as well as the age-related changes in hepatic CYP1A1 and CYP1A2 expression were in accordance with that de-

scribed previously [14–17, 38]. No studies about the ontogeny of hepatic CYP1B1 have been found. The developmental role of the CYP1 family described since prenatal until adult stages [19], along with the AhR influence in multiple mechanisms during normal development [39], could partially explain the lack of a complete agreement between the enzymes mRNA expression and the AhR cytoplasmic retention.

Concerning the phase II XMEs, its ontogeny has not been studied to the extent of phase I enzymes. Our results showed that NQO1 was the main hepatic enzyme, whereas in the mammary gland it was GSTP1. Although no significant age-dependent changes were observed in the mRNA expression of both enzymes in either tissue, their protein levels increased at PND100 in both tissues for NQO1 and in the liver for GSTP1. The lack of correlation between mRNA and protein levels has been widely described for XMEs [13]. Several levels of regulation, including posttranslational modifications, seem to be essential in maintaining the proper XMEs function [40].

The analysis of the balance between hepatic phase I/phase II mRNA expression revealed an increase in phase I and/or a decrease in phase II with age in the LF and, especially, HCO groups, while this balance remained unmodified due to the HOO diet. This suggests that diet may modify the age-related differences in the hepatic capacity to metabolize xenobiotics. In the mammary gland, an increased ratio was shown at PND36 in all groups, especially marked in the HCO group. This increase took place in the pubertal stage in which several functional changes occurred in the mammary gland and the diet may have influenced this particular window of vulnerability to xenobiotics in the mammary gland/ in this tissue.

In conclusion, the age-dependent changes in the XMEs expression in the rat liver and mammary gland may modify the susceptibility to the carcinogen and dietary lipids may modulate this ontogeny and, therefore, breast cancer risk. Although direct extrapolation of animal data to humans must be prevented, these results may be useful in understanding the mechanisms by which the breast cancer is an increasing healthcare problem in developed countries.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. M. Carmen Ruiz de Villa (Department of Statistics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) for her assistance in the statistical analyses of the data, and Ms. Carolina Romero for her technical assistant as a master's student. The sponsors had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of results, the preparation of

the manuscript, the decision to submit the manuscript for publication, or the writing of the manuscript.

REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–29.
2. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 2007.
3. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr* 2008;28:313–329.
4. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004;14:473–486.
5. Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 2010;31:135–148.
6. Hall M, Grover PL. Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumor initiation. In: Cooper, CS, Grover, PL, editors. *Chemical carcinogenesis and mutagenesis. Handbook of experimental pharmacology*. Heidelberg, Germany: Springer; 1990. Vol. 94/1, pp 327–372.
7. Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21:257–276.
8. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;206:73–93.
9. Köhle C, Bock KW. Coordinate regulation of phase I and phase II xenobiotic metabolism by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1853–1862.
10. Brauze D, Widerak M, Cwykiel J, Szyfter K, Baer-Dubowska W. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1a, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicol Lett* 2006;167:212–220.
11. Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway. *J Biol Chem* 2005;280:20340–20348.
12. Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol* 2011;85:273–284.
13. Saghir SA, Khan SA, McCoy AT. Ontogeny of mammalian metabolizing enzymes in humans and animals used in toxicological studies. *Crit Rev Toxicol* 2012;42:323–357.
14. Cui JY, Renaud HJ, Klaanssen CD. Ontogeny of novel cytochrome P450 gene isoforms during postnatal liver maturation in mice. *Drug Metab Dispos* 2012;40:1226–1237.
15. Asaoka Y, Sakai H, Sasaki J, Goryo M, Yanai T, Masegi T, Okada K. Changes in the gene expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 in juvenile Sprague-Dawley rats. *J Vet Med Sci* 2010;72:471–479.
16. Yun KU, Oh SJ, Oh JM, Kang KW, Myung CS, Song GY, Kim BH, Kim SK. Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch Toxicol* 2010;84:939–946.
17. Pałasz A, Wiaderkiewicz A, Wiaderkiewicz R, Czekaj P, Czajkowska B, Lebda-Wyborny T, Piwowarczyk A, Bryzek A. Age-related changes in the mRNA levels of CYP1A1, CYP2B1/2 and CYP3A1 isoforms in rat small intestine. *Genes Nutr* 2012;7:197–207.
18. Elbarbry FA, McNamara PJ, Alcorn J. Ontogeny of hepatic CYP1A2 and CYP2E1 expression in rat. *J Biochem Mol Toxicol* 2007;21:41–50.
19. Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1–4) during development and in different adult tissues. *Arch Biochem Biophys* 2005;436:50–61.
20. de Zwart L, Scholten M, Monbaliu JG, Annaert PP, Van Houdt JM, Van den Wyngaert I, De Schaepdrijver LM, Bailey GP, Coogan TP, Coussement WC, Mannens GS. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. *Reprod Toxicol* 2008;26:220–230.
21. Nakamura K, Fujiki T, Tamura HO. Age, gender and region-specific differences in drug metabolizing enzymes in rat ocular tissues. *Exp Eye Res* 2005;81:710–715.
22. Murray M. Role of signalling system in the effects of dietary factors in the expression of mammalian CYPs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007;3:185–196.
23. Köhle C, Bock KW. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2006;72:795–805.
24. Conney AH. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the seventh DeWitt S. Goodman lecture. *Cancer Res* 2003;63:7005–7031.
25. Ware WR. Nutrition and the prevention and treatment of cancer: association of cytochrome P450 CYP1B1 with the role of fruit and fruit extracts. *Integr Cancer Ther* 2009;8:22–28.
26. Nekvindová J, Anzenbacher P. Interactions of food and dietary supplements with drug metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Ceska Slov Farm* 2007;56:165–173.
27. Hidestrand M, Shankar K, Ronis MJ, Badger TM. Effects of light and dark beer in hepatic cytochrome P-450 expression in male rats receiving alcoholic beverages as part of total enteral nutrition. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:888–895.
28. Fujita K. Food-drug interactions via human cytochrome P4503A (CYP3A). *Drug Metabol Drug Interact* 2004;20:195–217.
29. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:7–20.
30. Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:915–927.
31. 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.
32. Moral R, Escrich R, Solanas M, Vela E, Costa I, de Villa MC, 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.
33. 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.
34. Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, 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.
 35. Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menéndez JA, 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.
 36. Dudley AC, Peden-Adams MM, EuDaly J, Pollenz RS, Keil DE. An aryl hydrocarbon receptor independent mechanism of JP-8 jet fuel immunotoxicity in Ah-Responsive and Ah-Nonresponsive Mice. *Toxicol Sci* 2001;59:251–259.
 37. Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:297–316.
 38. Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21:257–276.
 39. Mitchell KA, Elferink CJ. Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity. *Biochem Pharmacol* 2009;77:947–956.
 40. Aguiar M, Masse R, Gibbs BF. Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metab Rev* 2005;37:379–404.

Dietary extra-virgin olive oil and corn oil differentially modulate the mRNA expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and in the mammary gland in a rat chemically induced breast cancer model

Miguel Á. Manzanares^{a,*}, Montserrat Solanas^{a,*}, Raquel Moral^a, Raquel Escrich^a, Elena Vela^a, Irmgard Costa^{a,b} and Eduard Escrich^a

High extra-virgin olive oil (EVOO) and corn oil diets differentially modulate experimental mammary carcinogenesis. We have investigated their influence on the initiation stage through the modulation of the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes (XMEs) in the liver and the mammary gland. Female Sprague–Dawley rats were fed a low-fat (LF), high corn oil (HCO), or high EVOO (HOO) diet from weaning and gavaged with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). The HCO diet increased the mRNA levels of the phase I enzymes CYP1A1, CYP1A2 and, to a lesser extent, CYP1B1, in the liver. The Aryl hydrocarbon receptor (AhR) seemed to be involved in this upregulated CYP1 expression. However, a slight trend toward an increase in the mRNA levels of the phase II enzymes GSTP1 and NQO1 was observed with the HOO diet. At least in the case of GSTP1, this effect was linked to an increased Nrf2 transactivation activity. This different regulation of the XMEs expression led, in the case of the HCO diet, to a balance between the production of active carcinogenic compounds and their inactivation tilted toward phase I, which would stimulate DMBA-induced cancer initiation, whereas the HOO diet was associated

with a slower phase I metabolism accompanied by a faster phase II detoxification, thus reducing the output of the active compounds to the target tissues. In the mammary gland, the differential effects of diets may be conditioned by the state of cell differentiation, sexual maturity, and hormone metabolism. *European Journal of Cancer Prevention* 00:000–000 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Cancer Prevention 2014, 00:000–000

Keywords: breast cancer, mediterranean diet, *n*-6 polyunsaturated fatty acids, virgin olive oil, xenobiotic metabolism

^aDepartment of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona and ^bDepartment of Pathology, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Spain

Correspondence to Eduard Escrich, PhD, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Medical Physiology Unit, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain
Tel: +34 935 811 423; fax: +34 935 812 986; e-mail: eduard.escrich@uab.es

*Miguel Á. Manzanares and Montserrat Solanas contributed equally to the writing of this article.

Received 6 February 2014 Accepted 12 March 2014

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide, and one of the most important causes of death among women in high-income countries (Siegel *et al.*, 2013). Environmental factors and lifestyle, including food and nutrition, are involved in its etiology (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2007). Many exogenous compounds have been described as potential environmental chemical carcinogens for humans (Wogan *et al.*, 2004; Irigaray and Belpomme, 2010). Nutrition and diet could play a dual role in carcinogenesis. Some foods can be carriers for toxins, environmental contaminants, or deleterious products originating from their processing (Ferguson and Philpott, 2008), whereas others, especially of vegetable origin, are rich in bioactive compounds with a protective action in carcinogenesis (Kohlmeier *et al.*, 1995; Ferguson and Philpott, 2008; Shu *et al.*, 2010).

Dietary lipids have been described as important modulators of breast cancer development (Escrich *et al.*,

2006). Diets rich in saturated fat and especially *n*-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) stimulate experimental mammary carcinogenesis, whereas *n*-3 PUFA have inhibitory effects (Fay *et al.*, 1997; Bartsch *et al.*, 1999; Lee and Lin, 2000), and monounsaturated fatty acids (MUFA), primarily oleic acid, seem to be protective (Bartsch *et al.*, 1999; Escrich *et al.*, 2006). The Mediterranean diet, characterized by the high consumption of extra-virgin olive oil (EVOO), which is rich in oleic acid and minor bioactive compounds, has traditionally been associated with lower rates of some cancers (Escrich *et al.*, 2006; World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2007; Bosetti *et al.*, 2009; Caramia *et al.*, 2012).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental carcinogens formed from the incomplete pyrolysis of organic materials. They need to be modified by the xenobiotic-metabolizing enzymes (XMEs) to be excreted from the organism. This metabolism is divided into two phases. In phase I, CYP1A1, CYP1A2, and

CYP1B1, members of the Cytochrome P450 family 1 (CYP1), perform a first oxidation responsible for PAH activation to their oxygenated and more carcinogenic products. Several phase II enzymes, including glutathione S-transferase (GSTs) and NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), modify these oxygenated products to their inactive and more water-soluble forms (Hall and Grover, 1990; Xue and Warshawsky, 2005; Shimada, 2006). The phase I XMEs expression is mainly regulated by the ligand-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). A long list of AhR-activators, including environmental contaminants, therapeutics, naturally occurring chemicals, and small molecules endogenously synthesized and isolated from mammalian tissues, have been identified. Phase II genes battery is linked to a second transcription factor termed NF-E2-related factor 2 (Nrf2), also involved in protection against oxidative stress (Miao *et al.*, 2005; Brauze *et al.*, 2006; Köhle and Bock, 2007; Nguyen and Bradfield, 2008; Slocum and Kensler, 2011). Numerous dietary compounds with cancer-chemopreventive activities appear to modify the expression or the activity of components of xenobiotic metabolism (Conney, 2003; Köhle and Bock, 2006; Murray, 2007).

To gain an insight into the mechanisms by which high corn oil (HCO), rich in *n*-6 PUFA, and high EVOO (HOO) diets may modulate mammary carcinogenesis differentially, we aimed to investigate their influence on the initiation stage by means of the modulation of the XMEs expression in the liver and the mammary gland. We have used the useful experimental breast cancer model induced with the PAH 7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene (DMBA), where we have shown that adenocarcinomas are morphologically and histologically similar to human mammary tumors (Costa *et al.*, 2002). We showed previously that these diets may act during cancer initiation by differentially affecting the growth and sexual maturation of rats, thus altering the susceptibility of the mammary gland to cancer development (Moral *et al.*, 2011).

Materials and methods

Animals and experimental design

Biological samples were obtained previously from 57 female Sprague–Dawley rats (Moral *et al.*, 2011). Animals were purchased from Crl:OFA (Lyon, France) on post-natal day (PND) 23 and maintained under standard conditions. The day after arrival (PND24), six rats were killed, and the remaining ones were fed different diets: a low-fat (LF) diet (3% corn oil) (group LF, *n* = 37), high corn oil (HCO) diet (20% corn oil) (group HCO, *n* = 37), and a high extra-virgin olive oil (HOO) diet (3% corn oil and 17% EVOO) (group HOO, *n* = 37). The definition, preparation, and suitability of the experimental diets have been described previously (Escrich *et al.*, 1994a, 1994b; Solanas *et al.*, 2002; Moral *et al.*, 2011). Mammary cancer was induced with a 5 mg single dose of DMBA (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) at 53 days

of age. At PND36 (*n* = 6 per group), PND51 (*n* = 6 per group), and PND100 (*n* = 5 per group), rats were euthanized. At necropsy, livers and mammary glands were washed with physiological serum, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for molecular analyses.

RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR

Total RNA was isolated from the liver using the RNeasy Mini Kit (QiaGen, Hilden, Germany) and the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QiaGen) for mammary glands, according to the manufacturer. RNA was quantified by using NanoDrop1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). The RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Synthesis of cDNA was performed according to the High-Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The thermal cycling conditions were: 10 min at 25°C , 120 min at 37°C , and 5 s at 85°C . Real-time PCR was carried out in accordance with the instructions of the manufacturer of TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies Corporation, Grand Island, New York, USA). Specific Gene TaqMan Assays used were as follows: Cyp1a1 (Rn00487218_m1), Cyp1a2 (Rn00561082_m1), Cyp1b1 (Rn00564055_m1), Nqo1 (Rn00566528_m1), Gstp1 (Rn00561378_gH), and Hprt (Rn01527840_m1) as the housekeeping control gene. PCR reactions were performed in duplicate for each sample in a MyiQ Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) under the following conditions: 10 min at 95°C , followed by 15 s at 95°C and 60 s at 60°C for 40 cycles. Cycle thresholds (C_t) for each sample were obtained and $2^{-\Delta C_t}$ was calculated.

Protein extraction

Liver tissue were homogenized in 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, and 250 mmol/l sucrose and centrifuged at 10 000g for 20 min at 4°C . The supernatant was collected and ultracentrifuged at 105 000g for 1 h at 4°C . The supernatant was stored at -80°C as the cytosolic fraction and the pellet was resuspended in 100 mmol/l NaHPO₄, 1 mmol/l EDTA, and 1 mmol/l DTT, and ultracentrifuged at 105 000g for 1 h at 4°C . The pellet was stored at -80°C as the microsomal fraction. For the total tissue lysate, the liver was homogenized by sonication according to Dudley *et al.* (2001), with some modifications. Briefly, frozen tissues were sonicated in RIPA buffer (0.5% Na Deoxycholate, 0.1% SDS, and 1% Nonidet P-40) with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin for 15 s. 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) was then added. Samples were again sonicated and the final extract was diluted in RIPA buffer with protease inhibitors and stored at -80°C . All procedures were carried out at $0-4^{\circ}\text{C}$. The protein concentration was measured using Lowry assays (Bio-Rad Laboratories).

Western blot analysis

Protein expression was measured using total extracts. Samples were resolved by 8–12% SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Primary antibodies used were Nrf2 (1:2000) from Abcam (Cambridge, UK) and AhR (1:10 000) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Immunoreactive proteins were visualized using the Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA). Densitometric values of bands were normalized to the mean value of three replicates of a control sample extract and then to micrograms of protein loaded.

Immunoprecipitation

Liver cytosolic extracts were immunoprecipitated with Pure Proteome ProteinG Magnetic Beads (Millipore Corporation). Briefly, 50 μ l of magnetic beads were washed with 500 μ l PBS-Tween 0.1% and then 100 μ l of the antibody solution (AhR, 1:100, or Nrf2, 1:500) (Abcam) was added. A shaking incubation was carried out for 20 min at room temperature. Conjugated antibody beads were incubated overnight at 4°C with 200 μ l of the protein extract dilution at a concentration of 2 μ g/ μ l. Then, beads were heated for 10 min at 90°C in 50 μ l Laemli Buffer 1X (Bio-Rad Laboratories) containing 5% 2-Mercaptoethanol and, finally, 20 μ l of the solution was analyzed by western blot using Hsp90 (1:2000; Abcam) or Keap1 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology Inc.) for the AhR or Nrf2 immunoprecipitated samples, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA). The distribution of each variable was determined using the Kolmogorov–Smirnov test and the equality of variances among groups was assessed using Leven's test. Quantitative data were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney's *U*-test and qualitative data using Pearson's χ^2 -test. Correlations were carried out using Kendall's Tau-b and Spearman's Rho tests. The level of significance was established at *P* value less than 0.05.

Results

The analysis of liver phase I enzymes expression showed a general trend toward an increase because of the HCO diet. Thus, the CYP1A2 mRNA levels were upregulated in the HCO group significantly at PND51 and PND100. The CYP1A1 mRNA expression was also increased significantly, although only at PND51 (*P* < 0.05 vs. LF), and that of the CYP1B1 mRNA at PND100 (*P* < 0.05 vs. HOO) (Fig. 1a).

The role of AhR in the changes observed in mRNA levels was then examined (Fig. 1b). The AhR cytoplasmic retention was significantly lower in the HCO group than in the HOO group at PND51. Moreover, at this age, the HCO group tended to show higher AhR protein levels.

Both results would be in accordance with an increase in the AhR translocated to the nucleus because of the HCO diet and, therefore, with the higher mRNA expression of phase I enzymes observed. Similarly, the higher cytoplasmic AhR retention in the HOO group compared with the HCO group at PND51 was in line with the lower mRNA levels of the phase I enzymes in the HOO group.

In terms of the expression of phase II enzymes in the liver, the GSTP1 mRNA expression was higher in the HOO group than in the others at PND36 and especially PND100 (*P* < 0.05). The NQO1 mRNA levels tended to be quite similar among groups, except at PND51, when they were significantly reduced because of the HCO diet (*P* < 0.05 vs. LF) (Fig. 2a).

The analysis of Nrf2 showed a noticeable and significantly reduced cytoplasmic retention owing to the HOO diet at PND100, in agreement with the increased GSTP1 mRNA levels (Fig. 2b). Moreover, at this age, Nrf2 protein levels were significantly reduced because of the HCO diet (*P* < 0.05 vs. HOO).

To clarify the overall effect of dietary lipids on the liver XMEs expression, a ratio between the mRNA levels of phase I and II enzymes was calculated (Fig. 3). This ratio was higher in the HCO group than in the HOO and control groups, significantly at PND51 and PND100.

We also evaluated the effects of dietary lipids on the expression of XMEs in the carcinogen target tissue, where the capability to metabolize PAHs is related to its susceptibility to malignant transformation. We verified the null expression of the CYP1A2 isoform in the mammary tissue (data not shown). As in the liver, CYP1A1 mRNA levels were increased in the HCO group, especially at PND51 and PND100 (*P* < 0.05). At this last time point, the CYP1A1 expression was also increased in the HOO group, which showed the highest levels. At PND100, the CYP1B1 mRNA levels were also higher in the HOO group than in the HCO group, which showed the lowest levels (Fig. 1c).

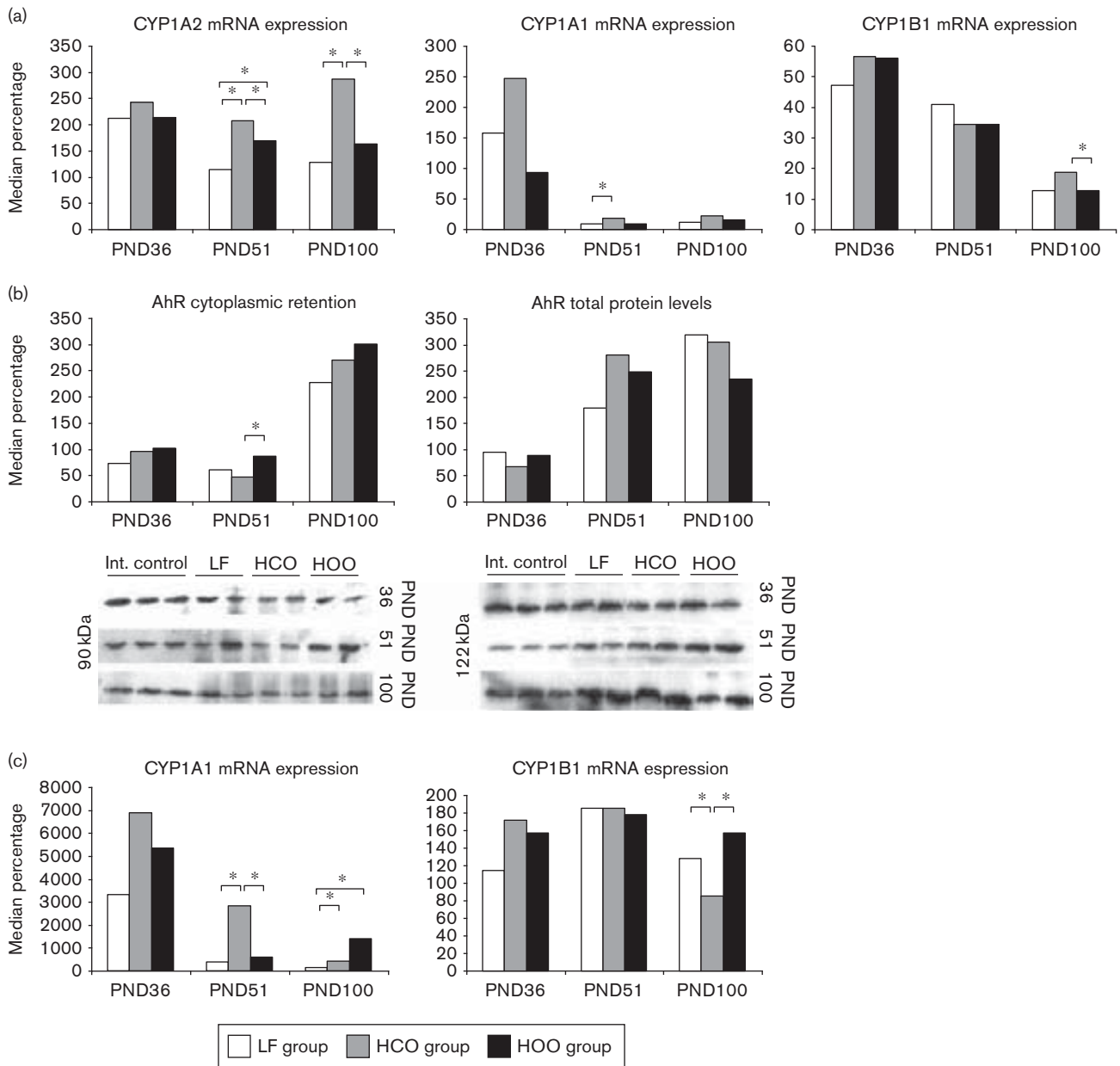
In terms of the phase II enzymes, the NQO1 expression in the mammary gland was not modified by dietary lipids unlike that of GSTP1. Thus, the HCO group showed significantly reduced GSTP1 mRNA levels at PND36 and PND100, when the HOO group showed the highest levels (*P* < 0.05 vs. LF) (Fig. 2c).

The ratio phase I versus phase II in the mammary gland increased significantly because of the HCO diet at PND36 (*P* < 0.05 vs. LF). No significant differences were observed at the other time points analyzed (Fig. 3).

Discussion

To our knowledge, this is the first work evaluating the influence of high EVOO and high corn oil diets on the expression of XMEs. Our results have shown that dietary

Fig. 1

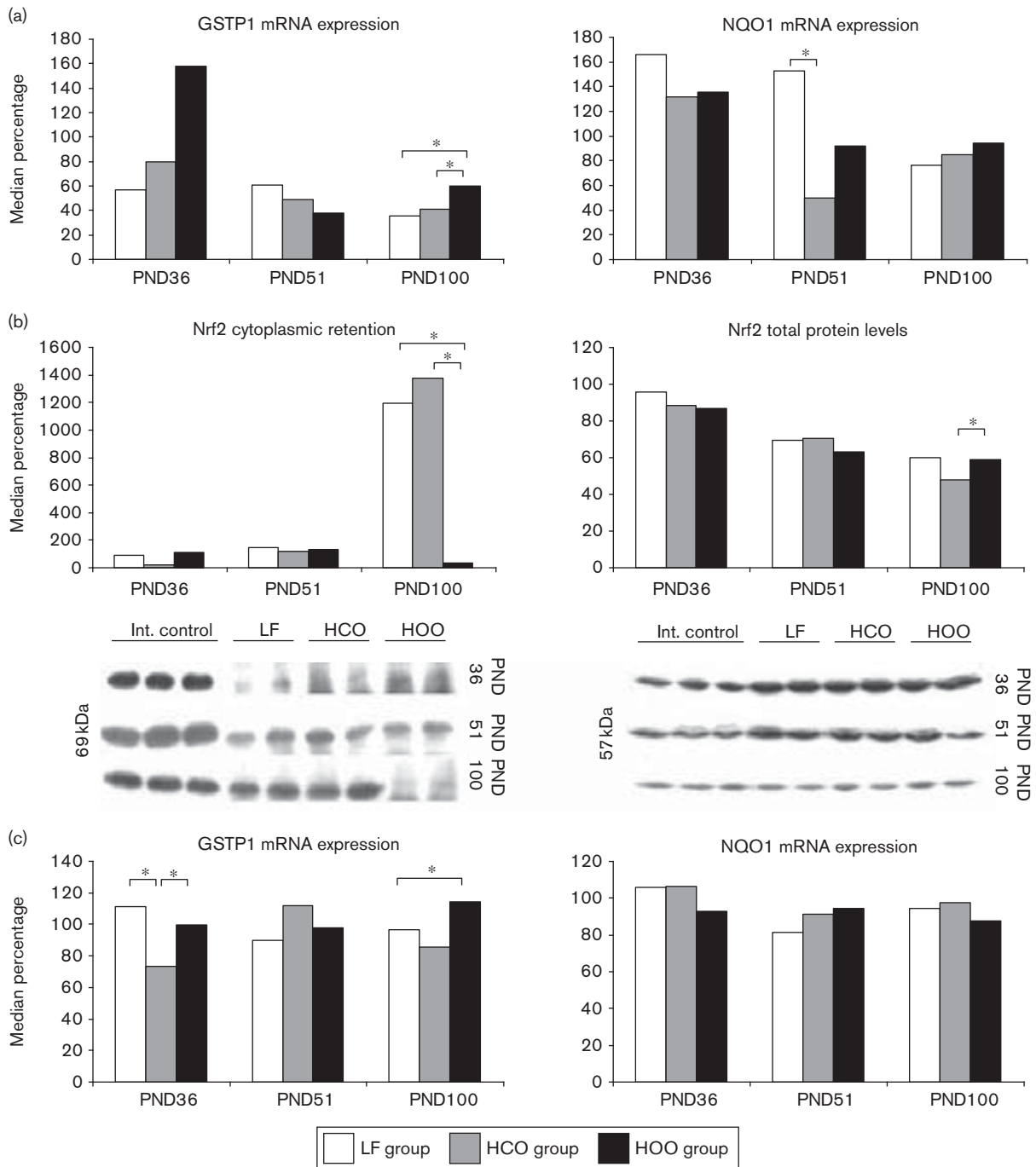


Effects of a low-fat (LF), high corn oil (HCO), and high olive oil (HOO) diet on the expression of phase I XMEs in an experimental breast cancer model. Median values and representative immunoblots for each group at the different time points studied [36, 51, and 100 postnatal days (PND)] are shown. (a) Relative mRNA levels of CYP1A2, CYP1A1, and CYP1B1 in the liver. (b) Role of AhR in the modulation of hepatic phase I enzymes expression by dietary lipids. From left to right: measurement of the AhR cytoplasmic retention by AhR immunoprecipitation and Hsp90 immunodetection, and AhR protein levels in total tissue lysates. (c) Relative mRNA levels of CYP1A1 and CYP1B1 in the mammary gland. All median values are relative to the corresponding PND24 value (%); * $P \leq 0.05$, nonparametric Mann-Whitney U -test.

lipids may modulate the constitutive mRNA expression of the phase I enzymes both in the liver, which is the main xenobiotic-metabolizing organ, and in the mammary gland, the carcinogen target tissue. Thus, the high *n*-6 PUFA diet tended to increase the CYP1A1 expression levels compared with the HOO and LF diets, which were quite similar to each other. The effect of the HCO diet

was observed in both tissues and at all ages studied, although the differences were not always statistically significant. After DMBA gavage (PND100), the mRNA levels in the mammary gland, but not in the liver, were upregulated by the two high-fat diets compared with the control diet. This different response could be because of changes in the mammary tissue of the DMBA-treated

Fig. 2

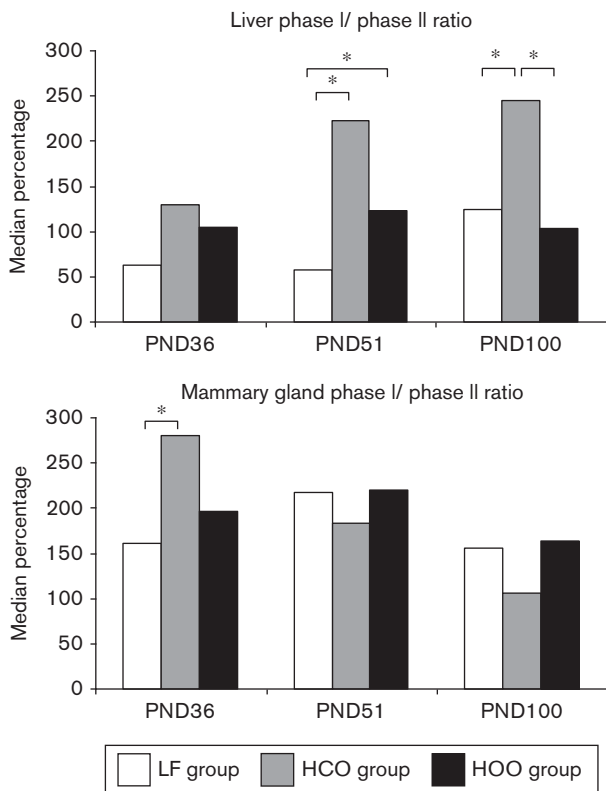


Effects of a low-fat (LF), high corn oil (HCO), and high olive oil (HOO) diet on the expression of phase II XMEs in an experimental breast cancer model. Median values and representative immunoblots for each group at the different time points studied [36, 51, and 100 postnatal days (PND)] are shown. (a) Relative mRNA levels of GSTP1 and NQO1 in the liver. (b) Role of Nrf2 in the modulation of hepatic phase II enzymes expression by dietary lipids. From left to right: measurement of the Nrf2 cytoplasmic retention by Nrf2 immunoprecipitation and Keap1 immunodetection, and Nrf2 protein levels in total tissue lysates. (c) Relative mRNA levels of GSTP1 and NQO1 in the mammary gland. All median values are relative to the corresponding PND24 value (%); * $P \leq 0.05$, nonparametric Mann-Whitney U -test.

animals (Yang *et al.*, 2008) as well as the different sexual maturation state of the animals at PND100 (Fu *et al.*, 2003; Moral *et al.*, 2011).

Whereas CYP1A1 shows a low constitutive expression in the mammary gland and liver, CYP1A2 is constitutively expressed in the liver, but not in extrahepatic tissues

Fig. 3



Ratio between the relative mRNA expression of the phase I and the phase II enzymes in the liver and in the mammary gland in an experimental breast cancer model. For each animal, a summation of the individual relative expression data for each enzyme for both the phase I and the phase II was performed and the division between them calculated. With the single ratio results, the median values for each experimental group were obtained and the effects of dietary lipids were analyzed. Effect of a low-fat (LF), high corn oil (HCO), and high olive oil (HOO) diet at the different time points studied [36, 51, and 100 postnatal days (PND)].

(Xue and Warshawsky, 2005; Shimada, 2006). The analysis of CYP1A2 expression also showed upregulated mRNA levels because of the HCO diet in the liver, especially at PND51 and PND100, whereas the high EVOO diet showed an effect similar to that of the control.

The CYP1B1 mRNA expression was lower than that of the other CYP1 in both tissues and the hepatic levels were lower than in the mammary gland, according to its constitutive expression in steroidogenic and steroid-responsive tissues (Buters *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2001). The influence of the dietary lipids on the CYP1B1 expression was delayed compared with the other CYPs as changes were only detected after DMBA treatment (PND100). Moreover, the effect was different depending on the tissue. Whereas in the liver the HCO diet increased the CYP1B1 mRNA levels, in line with the effect of this diet on the other CYP1 expression, in the mammary gland, the HCO group showed the lowest

levels. This particular expression pattern could be related to mammary gland differentiation and the importance of CYP1B1 in estrogen metabolism (Murray *et al.*, 2001) as well as the influence of the estrous cycle in the regulation of its expression (Fu *et al.*, 2003), among others.

Given that transcription is the principal mechanism by which the expression of most CYPs is controlled and AhR regulates the expression of CYP1 enzymes (Shimada, 2006; Köhle and Bock, 2007), we studied the liver AhR activation. A lower cytoplasmic retention was detected in the HCO group, although only significant at PND51. This was compatible with the AhR transactivation activity and the increase in the hepatic CYP1A1 and CYP1A2 mRNA expression because of this diet at this age. This effect would be in accordance with the possible role of certain fatty acids as potential AhR endogenous ligands (Nguyen and Bradfield, 2008).

The effect of dietary lipids on the phase II enzymes was not as evident as that on the phase I enzymes. Thus, the liver GSTP1 and NQO1 mRNA expression increased because of the HCO diet compared with the HCO diet at some time points studied, and not always significantly. The changes in GSTP1 mRNA levels were partly correlated to changes in the Nrf2 activation state, unlike those in NQO1. In general, the results suggest an increased Nrf2 transactivation activity because of the high EVOO diet. This effect could be part of an Nrf2-mediated protection against oxidative stress driven by the EVOO, which is well known for its antioxidant properties (Owen *et al.*, 2007). Polyphenols present in EVOO may account for the induction of phase II enzymes by means of their effect on the Nrf2, as described for several phenolic antioxidants (Conney, 2003; Talalay *et al.*, 2003; Higgins and Hayes, 2011). The fact that the NQO1 expression is regulated by both AhR and Nrf2, thus cross-interacting xenobiotic- responsive elements and antioxidant-responsive elements signaling (Köhle and Bock, 2007), could partly explain why NQO1 mRNA levels did not match Nrf2 activation, as GSTP1 did. In the mammary gland, the upregulation of the phase II XME expression because of the HOO was only observed for GSTP1. However, the NQO1 expression was quite similar among groups.

The analysis of the balance between the mRNA expression of phase I and phase II enzymes through the determination of the ratio allowed us to verify the influence of dietary lipids on the xenobiotic metabolism by means of the modulation of the involved enzymes expression. Thus, our results led us to hypothesize that, in the liver, the overall increase in the mRNA expression of phase I enzymes and the trend toward a decrease of phase II enzymes because of the HCO diet would induce a balance between the production of potential active carcinogenic compounds and their inactivation to tilt towards the first one, which would stimulate cancer

initiation in the target organ. It was not possible to measure the direct effect of the active compounds on the mammary gland as the experimental design of the study did not allow obtaining samples just after the DMBA treatment at PND53. However, this hypothesis would be in accordance with the earlier appearance of tumors, higher tumor incidence and multiplicity, and higher tumor morphological malignancy because of the HCO diet and, thus, with its well-characterized stimulatory effect on DMBA-induced mammary cancer described previously by our group (Solanas *et al.*, 2002, 2010; Costa *et al.*, 2004; Escrich *et al.*, 2011; Moral *et al.*, 2011). In contrast, the high EVOO diet was associated with a ratio more similar to that of the control, characterized by a slower liver phase I metabolism, accompanied by a faster phase II detoxification of the active compounds. This effect would reduce their output from the liver to other tissues, such as the mammary gland, and it would agree with the lower malignancy of the carcinogenesis because of the high EVOO diets and their already demonstrated nonstimulating effect or weak-stimulating one (Solanas *et al.*, 2002, 2010; Costa *et al.*, 2004; Escrich *et al.*, 2011; Moral *et al.*, 2011).

In the mammary gland, the differential effect of the HCO and HOO diets on the XME expression balance was only observed at PND36, suggesting, as it has already been argued, a tissue-specific effect as well as the influence of other factors, such as the mammary gland differentiation and sexual maturity.

In conclusion, we hypothesize that HCO and HOO diets may partly exert their differential modulatory effects on DMBA-induced mammary carcinogenesis through a specific modulation of the XMEs expression that can have a profound effect on susceptibility of the mammary gland to environmental carcinogens and, therefore, on the risk of cancer. The effect of the HCO diet on the xenobiotic metabolism would lead to a greater generation of active compounds in the liver, and probably also in the earlier ages in the mammary gland, which may effectively stimulate the carcinogenic process. In contrast, the high EVOO diet would induce a less malignant situation, similar to that of the control group or, in some cases, intermediate between this group and the HCO. We are currently carrying out an in-depth study to better understand the mechanisms of the XME expression regulation by dietary lipids and, especially, to establish the possible link between this modulation and cancer initiation.

Acknowledgements

The authors thank Dr M. Carmen Ruiz de Villa (Department of Statistics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) for her assistance with the statistical analyses of the data and Carolina Romero for her technical assistance as a Masters student.

This work was supported by grants from ‘Plan Nacional de I + D + I 2004-2007’ (AGL2006-07691); ‘Plan

Nacional de I + D + I 2007-2011’ (AGL2011-24778); ‘Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008-2012’ (FPCO2008-165.396); ‘Agencia para el Aceite de Oliva, Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino 2008-2012’ (AAO2008-165.471); and ‘Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Española 2009-2013’ (OIP2009-165.646).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Bartsch H, Nair J, Owen RW (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* **20**:2209–2218.
- Bosetti C, Pelucchi C, La Vecchia C (2009). Diet and cancer in Mediterranean countries: carbohydrates and fats. *Public Health Nutr* **12**:1595–1600.
- Brauze D, Widerak M, Cwykiel J, Szyfter K, Baer-Dubowska W (2006). The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1a, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicol Lett* **167**:212–220.
- Buters JC, Sakai S, Richter T, Pineau T, Alexander DL, Savas U, *et al.* (1999). Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1977–1982.
- Caramia G, Gori A, Valli E, Cerretani L (2012). Virgin olive oil in preventive medicine: from legend to epigenetics. *Eur J Lipid Sci Technol* **114**:375–388.
- Conney AH (2003). Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: The seventh DeWitt S. Goodman lecture. *Cancer Res* **63**:7005–7031.
- Costa I, Solanas M, Escrich E (2002). Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesion induced with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch Pathol Lab Med* **126**:915–927.
- Costa I, Moral R, Solanas M, Escrich E (2004). High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat* **86**:225–235.
- Dudley AC, Peden-Adams MM, EuDaly J, Pollenz RS, Keil DE (2001). An aryl hydrocarbon receptor independent mechanism of JP-8 jet fuel immunotoxicity in Ah-Responsive and Ah-Nonresponsive Mice. *Toxicol Sci* **59**:251–259.
- Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, Ribalta T, Muntane J, Segura R (1994a). Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *In Vivo* **8**:1107–1112.
- Escrich E, Solanas M, Segura R (1994b). Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: I-diet definition. *In Vivo* **8**:1099–1106.
- Escrich E, Solanas M, Moral R (2006). Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. In: Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P, editors. *Olive Oil and Health*. Oxford: CABI Publishing. pp. 317–374.
- Escrich E, Solanas M, Moral R, Escrich R (2011). Modulatory effects and molecular mechanism of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Curr Pharm Des* **17**:813–830.
- Fay MP, Freedman LS, Clifford CK, Midthune DN (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* **57**:3979–3988.
- Ferguson LR, Philpott M (2008). Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr* **28**:313–329.
- Fu X, Blaydes BS, Weis CC, Latendresse JR, Muskhelishvili L, Sutter TR, *et al.* (2003). Effects of dietary soy and estrous cycle on adrenal cytochrome p450 1B1 expression and DMBA metabolism in adrenal glands and livers in female Sprague-Dawley rats. *Chem Biol Interact* **146**:273–284.
- Hall M, Grover PL (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumor initiation. In: Cooper CS, Grover PL, editors. *Chemical carcinogenesis and mutagenesis. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. **94/1**; Heidelberg: Springer. pp. 327–372.
- Higgins LG, Hayes JD (2011). Mechanism of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab Rev* **43**:92–137.
- Irigaray P, Belpomme D (2010). Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **31**:135–148.
- Köhle C, Bock KW (2006). Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* **72**:795–805.

- Köhle C, Bock KW (2007). Coordinate regulation of phase I and phase II xenobiotic metabolism by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem Pharmacol* **73**:1853–1862.
- Kohlmeier L, Simonsen N, Mottus K (1995). Dietary modifiers of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* **103**:177–184.
- Lee MM, Lin SS (2000). Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr* **20**: 221–248.
- Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G (2005). Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway. *J Biol Chem* **280**: 20340–20348.
- Moral R, Escrich R, Solanas M, Vela E, Costa I, Ruiz de Villa MC, et al. (2011). 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.
- Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD (2001). Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:297–316.
- Murray M (2007). Role of signalling system in the effects of dietary factors in the expression of mammalian CYPs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **3**: 185–196.
- Nguyen LP, Bradfield CA (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* **21**:102–116.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalter B, Bartsch H (2000). Olive-Oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* **1**:107–112.
- Shimada T (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinetic* **21**:257–276.
- Shu L, Cheung KL, Khor TO, Chen C, Kong AN (2010). Phytochemicals: cancer chemoprevention of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **29**:483–502.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013). Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **63**:11–30.
- Slocum SL, Kensler TW (2011). Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol* **85**:273–284.
- Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menéndez JA, Colomer R, et al. (2002). 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.
- Solanas M, Grau L, Moral R, Vela E, Escrich R, Escrich E (2010). 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.
- Talalay P, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* **43**:121–134.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14**:473–486.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007). *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research.
- Xue W, Warshawsky D (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* **206**:73–93.
- Yang X, Solomon S, Fraser LR, Trombino AF, Liu D, Sonenshein GE, et al. (2008). Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue. *J Cell Biochem* **104**:402–417.

AUTHOR QUERY FORM

**LIPPINCOTT
WILLIAMS AND WILKINS**

JOURNAL NAME: CEJ

ARTICLE NO: ejcp061908

QUERIES AND / OR REMARKS

QUERY NO.	Details Required	Author's Response
Q1	Please check ref [KũÑhle and Bock, 2006; Yang et al ., 2008; Owen et al ., 2007] not listed in references. Please provide complete details to insert in the reference list.	