



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA DE LAS  
CÉLULAS TUMORALES COMO MECANISMO DE LOS EFECTOS  
MODULADORES DIFERENCIALES DE LOS ACEITES DE OLIVA  
VIRGEN EXTRA Y DE MAÍZ EN LA CARCINOGENESIS MAMARIA  
EXPERIMENTAL**

Memoria presentada por MERITXELL PELICANO ESQUETA para optar al grado de Doctora 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 Autónoma de Barcelona, estando adscrito al programa de Doctorado de Biología Celular.

Meritxell Pelicano Esqueta

Montserrat Solanas García

Eduard Escrich Escriche

Bellaterra, julio 2015.



Este trabajo ha sido cofinanciado en parte mediante ayudas del Plan Nacional de I+D+I [2004-2007] (AGL2006-07691/ALI); [2008-2011] (AGL2011-24778), Fundación Patrimonio Comunal Olivarero (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), Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español (OIP2009-165.646) i “Departaments 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 mi familia



Smile, without a reason why  
Love, as if you were a child  
Smile, no matter what they tell you  
Don't listen to a word they say  
'cause life is beautiful that way

Tears, a tidal wave of tears  
Light, that slowly disappears  
Wait, before you close the curtain  
There's still another game to play  
and life is beautiful that way

Here, in his eyes forever more  
I will always be as close  
as you remember from before  
Now, that you're out there on your own  
Remember what is real  
and what we dream is love alone.

Keep, the laughter in your eyes  
Soon, your long awaited prize  
Well, forget about our sorrow  
And think about a brighter day  
'cause life is beautiful that way.

Smile, without a reason why...

**Noa (Beautiful that way)**



Cap tesi està totalment acabada sense haver agraït a totes aquelles persones que han compartit el temps i l'esforç que implica fer-la

En primer lloc vull agraïr als dos co-directors del treball.

Ai Dr. Eduard Escrich, professor del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia e Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i director del Grup Multidisciplinar per l'Estudi del Càncer de Mama per haver-me donat la oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral dins del seu grup i per la seva confiança en el meu treball.

A la Dra. Montserrat Solanas, professora del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia e Immunologia, co-Directora del treball, per les seves lliçons, la seva impagable ajuda, les paraules de suport en els mals moments i els somriures compartits en els bons. Gràcies per les idees que han anat sorgint i que ens han fet emocionar-nos i sobretot pel seu seguiment en la última etapa, potser la més dura però també la més gratificant i que m'ha fet tornar a confiar en mi mateixa. Per ser un exemple com a professional, però sobretot com a dona.

Com a becària PIF vull agraïr al doctor Xavier Navarro, director del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia e Immunologia pel seu tracte cordial i les paraules d'ànims que sovint m'ha transmès.

Ais meus companys de laboratori que ja no hi són Laura Muntaner, Laura Acerete, Pedro Maseres, Nadia Bravitz, Marta Fontcuberta, Isabel Sospedra, Montse Moreno i en especial al Miguel Manzanares, company de "promoció" i gran amic, per tots els moments viscuts al M4-120 i fora d'ell. A la resta de companyes Irmgard Costa, Raquel Moral, Raquel Escrich, Alèxia Gómez i Elena Catalán per les estones compartides i sobretot a la Cristina Rodriguez i Cristina de Miguel per la gran complicitat creada durant aquest temps, per ser bones companyes i millors amigues, per la seva alegria i bon humor i per la seva gran professionalitat.

A Marina Portantier per la col·laboració durant l'estandarització de l'aïllament de DRMs en fetge. D'igual manera, a Sarai Pacheco, per trobar una de les referències bibliogràfiques que farien possible la realització d'aquesta tesi. Tot i que no les he arribat a conèixer mai, un trosset d'aquest treball també és seu.

A les alumnes internes Maria, Anna i Queralt, per la seva participació en la serie experimental d'aquest treball,

A la Dra. María del Carmen Ruiz de Villa, Professora del departament de Bioestadística de la Universitat de Barcelona, per la seva dedicació e imprescindible col·laboració en el tractament estadístic de les dades del treball.

Ai Dr. Carles Gil i als membres del seu grup, per ensenyar-nos la tècnica d'aïllament de fraccions de membrana i per facilitar-nos el treball al seu laboratori sempre que ho hem necessitat. Agraïr també a la resta de membres de la facultat que en algun moment ens han ajudat. Les Dres. Belén Pérez, Victòria Cios i Elisabeth Vila, de la unitat de farmacologia, per deixar-nos part del seu material i de les seves instal·lacions, al Dr. Toni Morros de biofísica, per solucionar-nos alguns dubtes sobre aspectes teòrics del treball i als Drs. Pepi Sabrià i Enrique Claro de bioquímica per endinsar-nos en l'apassionant món dels *Lipid Droplets*. Perquè en el fons, quan més es gaudeix de la recerca és quan es pot compartir.

Ai personal del Servei de l'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona per la seva col·laboració i amabilitat.

A Olatz Fresnedo y Lino Arisketa per ensenyar-nos la tècnica de la TLC i haver solucionat tots els dubtes que han sorgit. Gràcies per acollir-nos i compartir els vostres coneixements amb nosaltres.

A M. Paz Romero per la seva col·laboració en la cromatografia de gasos.

Ai personal del PAS de la facultat de medicina, sobretot a Hortènsia Ojeda, Mònica Espejo i Ghizlane El Korchi, per fer-nos la vida una mica més fàcil a tots.

Ais companys del grup de Neurofisiologia, per haver-nos ajudat sempre que ho hem necessitat i per la bona relació que s'ha anat creant durant aquesta etapa.

A la Maite, per alegrar-nos els matins.

A mis padres, por ser mi referente en esta vida, por darme todo sin pedir nada a cambio, por todos sus sacrificios para que yo pudiera llegar hasta aquí, porque sin ellos no lo hubiera conseguido. A mi padre Tomás, por ser un hombre valiente y honrado, por ser uno de los hombres de mi vida y por darme una educación basada sobre todo en el cariño y el respeto hacia los demás, y a mi madre Paqui por ser un ejemplo como mujer, mi mejor amiga y confidente, porque ella me ha enseñado a valorar lo que realmente importa en esta vida, por sus esfuerzos no siempre agradecidos y por ayudarme, sin juzgarme, en mis malos momentos.

A l'Adrià per fer-me enfadar i somriure alhora, per haver canviat la meua vida fa 8 anys quan et vaig tenir per primera vegada en braços, per ensenyar-me a veure la vida desde la teua perspectiva. Estic totalment convençuda que aconseguiràs tot el que et proposis en aquesta vida, no deixis que mai ningú et digui el contrari.

A mi hermano José Luis y a Sonia por todas las experiencias compartidas, el cariño que me han dado y sobre todo su apoyo y palabras de ánimo siempre que las he necesitado.

A la Tamara, per tots els Cafès que no hem fet i que hem de recuperar. Perquè encara que ens veiem poc, sembla que el temps no passi entre trobada i trobada. El món necessita més gent com tu.

A la Raquel, la Marcela, l'Anna G., l'Anna S., la Laura M., la Laura A., l'Eva, la Mireia, la Yolanda i a totes les demés per haver creat una "família".

A les "tietes", que ja saben qui són, per ser com són.

Al Manel, per escoltar-me i aconsellar-me sempre que ho he necessitat. Per ser un gran amic.

Als amics de l'empresa Ingimec, per ser part de la família, sobretot al Andreu, al David, al Javi, al Jordi i a la Raquel per totes les "birres" que hem compartit i a la resta de l'equip tècnic i humà, que sempre m'han tractat com una més.

A Raúl y Vanessa por su generosidad, su simpatía y cariño. Por hacerme desconectar en tierras del norte y por los ánimos que me han dado durante todo este tiempo. Eskerrik asko.

A Dani, sobran las palabras. Por quererme con todos mis defectos y hacerme ver las cosas desde otra perspectiva, pero sobre todo por hacerme feliz y por darme el mejor regalo de esta vida. Porque ya no imagino una vida sin ti, gracias por compartir estos duros años conmigo, por apoyarme y regañarme cuando era necesario. Te quiero.

A Marc, por ser el motor de mi vida. Mi rubio de ojos azules que cada día me hace aprender cosas nuevas y que me saca una sonrisa en los peores momentos. T'estimo.







<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>ÍNDICE DE TABLAS</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS DEL ANEXO</u></b> .....	<b>9</b>
<b><u>ABREVIATURAS</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>RESUMEN</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	<b>17</b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>19</b>
A. <u>DESARROLLO ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA</u> .....	21
1. HUMANA .....	21
2. RATA .....	22
B. <u>CÁNCER DE MAMA</u> .....	25
1. FACTORES ENDOCRINOS .....	28
2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS .....	30
3. FACTORES AMBIENTALES .....	35
C. <u>LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA</u> .....	37
1. CRECIMIENTO, MADURACIÓN SEXUAL Y OBESIDAD .....	40
2. INFLUENCIA SOBRE EL ESTATUS HORMONAL .....	43
3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR .....	45
4. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES .....	46
5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	48
6. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO .....	51
7. ESTRÉS OXIDATIVO .....	53
8. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS .....	55
D. <u>MODELO EXPERIMENTAL</u> .....	56
E. <u>MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN CÁNCER DE MAMA: CAMBIOS EN LA MEMBRANA CELULAR</u> .....	61
1. MEMBRANA CELULAR. CARACTERÍSTICAS .....	61
2. MICRODOMINIOS DE MEMBRANA: <i>LIPID RAFTS</i> Y CAVEOLAS .....	65
2.1. <i>LIPID RAFTS</i> ENRIQUECIDOS EN COLESTEROL .....	65
2.2. CAVEOLAS.....	70
2.3. MICRODOMINIOS ENRIQUECIDOS EN COLESTEROL Y VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE P21RAS.....	76
2.4. <i>LIPID RAFTS</i> ENRIQUECIDOS EN CERAMIDA.....	78
3. INFLUENCIA DE FACTORES DIETÉTICOS .....	81
F. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> .....	85

<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	<b>87</b>
A. <u>ENSAYOS BIOLÓGICOS</u> .....	89
1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	89
2. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES .....	91
3. DIETAS EXPERIMENTALES .....	91
4. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS .....	94
5. EXPLORACIONES PERIÓDICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA .....	95
B. <u>TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR</u> .....	97
1. AISLAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA .....	98
2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	99
3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT .....	100
4. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS .....	101
5. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN FRACCIONES DE MEMBRANA DE HÍGADO .....	102
6. ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	102
7. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	107
C. <u>ANÁLISIS DE LOS DATOS</u> .....	108
1. ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	109
1.1. CARCINOGENÉISIS .....	109
1.2. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y LA MASA CORPORAL .....	109
2. BIOLOGÍA MOLECULAR .....	110
<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>111</b>
A. <u>EVOLUCIÓN PONDERAL, PATOLOGÍA MAMARIA Y PARÁMETROS DE LA CARCINOGENÉISIS</u> .....	113
1. EVOLUCIÓN PONDERAL .....	113
2. HISTOPATOLOGÍA MAMARIA .....	115
3. PARÁMETROS DE LA CARCINOGENÉISIS .....	118
3.1. TIEMPO DE LATENCIA .....	118
3.2. INCIDENCIA .....	118
3.3. CONTENIDO TUMORAL TOTAL .....	119
3.4. VOLUMEN TUMORAL TOTAL .....	120
B. <u>ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE AISLAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA EN HÍGADO DE RATA Y VALIDACIÓN EN ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES</u> .....	122

## Índice

C. <u>CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES</u> .....	128
1. COMPOSICIÓN EN TIPOS DE LÍPIDOS .....	128
2. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS .....	134
2.1. MEMBRANA TOTAL.....	134
2.2. MEMBRANA SOLUBLE.....	137
D. <u>EFFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES</u> .....	140
1. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN PROTEICA.....	140
1.1. FLOT1 .....	140
1.2. CAV1 .....	140
2. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA .....	142
2.1. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LÍPIDOS .....	142
2.1.1. MEMBRANA TOTAL.....	142
2.1.2. MEMBRANA SOLUBLE.....	143
2.1.3. <i>LIPID RAFTS</i> .....	144
2.1.4. CAVEOLAS.....	150
2.2. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS .....	152
2.2.1. MEMBRANA TOTAL.....	152
2.2.2. MEMBRANA SOLUBLE.....	158
2.3 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA CD95 .....	164
3. ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES .....	165
3.1. NIVELES DE LOS PRINCIPALES LÍPIDOS FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> (COL Y SM) Y CAV1 .....	165
3.2. NIVELES DE LOS PRINCIPALES LÍPIDOS FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> (COL Y SM) Y DEL PRINCIPAL LÍPIDO FORMADOR DE <i>CER-RAFTS</i> (CER) .....	166
3.3. NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS, Y LÍPIDOS Y PROTEÍNAS FORMADORES DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA .....	166
3.3.1. NIVELES DE SFA EN MEMBRANA TOTAL Y LÍPIDOS FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> .....	166
3.3.2. NIVELES DE SFA EN MEMBRANA TOTAL Y CAV1 .....	167
3.3.3. NIVELES DE MUFA EN MEMBRANA TOTAL Y LÍPIDOS FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> .....	167
3.3.4. NIVELES DE MUFA EN MEMBRANA TOTAL Y CAV1 .....	168
3.3.5. NIVELES DE PUFA EN MEMBRANA TOTAL Y LÍPIDOS FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> .....	168
3.3.6. NIVELES DE PUFA EN MEMBRANA TOTAL Y CAV1 .....	169
3.4. NIVELES DE LA PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA CD95, CERAMIDA Y ÁCIDOS GRASOS .....	169

## Índice

3.4.1. NIVELES DE CD95 EN MEMBRANA TOTAL Y CERAMIDA EN LR .....	169
3.4.2. NIVELES DE CD95 Y SFA EN MEMBRANA TOTAL .....	170
3.4.3. NIVELES DE CD95 Y MUFA EN MEMBRANA TOTAL .....	170
3.4.4. NIVELES DE CD95 Y PUFA EN MEMBRANA TOTAL .....	171
3.5. RATIO SM/CER, INDICADOR DE LA FORMACIÓN DE PLATAFORMAS DE CERAMIDA, CAV1 Y ÁCIDOS GRASOS .....	171
3.5.1. RATIO CER/SM EN LR Y CAV1 .....	171
3.5.2. RATIO CER/SM EN LR Y SFA EN MEMBRANA TOTAL .....	171
3.5.3. RATIO CER/SM EN LR Y MUFA EN MEMBRANA TOTAL .....	172
3.5.4. RATIO CER/SM EN LR Y PUFA EN MEMBRANA TOTAL.....	172
3.6. GRADO DE MALIGNIDAD TUMORAL, NIVELES DE CAV1 Y DE ÁCIDOS GRASOS .....	172
3.6.1. GRADO TUMORAL Y NIVELES DE CAV1 .....	172
3.6.2. GRADO TUMORAL Y NIVELES DE SFA EN MEMBRANA TOTAL.....	173
3.6.3. GRADO TUMORAL Y NIVELES DE MUFA EN MEMBRANA TOTAL.....	173
3.6.4. GRADO TUMORAL Y NIVELES DE PUFA EN MEMBRANA TOTAL.....	174
3.7 ACTIVIDAD DE P21RAS, LÍPIDOS PRINCIPALES FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> , CAV1 Y ÁCIDOS GRASOS DE MEMBRANA TOTAL.....	174
3.7.1. NIVELES DE P21RAS-GTP, E ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE P21RAS, Y NIVELES DE LÍPIDOS FORMADORES DE <i>CHOL-RAFTS</i> .....	174
3.7.2. NIVELES DE P21RAS-GTP, E ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE P21RAS, Y NIVELES DE CAV1.....	175
3.7.3. NIVELES DE P21RAS-GTP, E ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE P21RAS, Y NIVELES DE SFA EN MEMBRANA TOTAL .....	176
3.7.4. NIVELES DE P21RAS-GTP, E ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE P21RAS, Y NIVELES DE ÁCIDO PALMÍTICO EN MEMBRANA TOTAL .....	176
3.7.5. NIVELES DE P21RAS-GTP E ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE P21RAS Y NIVELES DE MUFA EN MEMBRANA TOTAL.....	177
3.7.6. NIVELES DE P21RAS-GTP, E ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE P21RAS, Y NIVELES DE MUFA EN MEMBRANA TOTAL.....	178

## **DISCUSIÓN .....**179

### **A. EVOLUCIÓN PONDERAL, CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y**

<b><u>PARÁMETROS DE LA CARCINOGENÉISIS</u></b> .....	181
1. EVOLUCIÓN PONDERAL .....	181
2. HISTOPATOLOGÍA MAMARIA .....	181
3. PARÁMETROS DE LA CARCINOGENÉISIS .....	183

## Índice

B. <u>ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE AISLAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA EN HÍGADO DE RATA Y SU VALIDACIÓN EN ADEONCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES</u> .....	188
C. <u>CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES</u> .....	191
D. <u>EFFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES</u> .....	197
1. <u>EFFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN PROTEICA</u> .....	197
2. <u>EFFECTO DE LOS LIPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA</u> .....	199
2.1. <u>CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE TIPOS DE LÍPIDOS</u> .....	199
2.2. <u>CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS</u> .....	203
3. <u>ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES</u> .....	209
E. <u>BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS</u> .....	211
 <b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>219</b>
 <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>225</b>
 <b><u>ANEXO</u></b> .....	<b>253</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructuras epiteliales de la glándula mamaria .....	23
<b>Figura 2:</b> Topografía de la glándula mamaria de rata .....	25
<b>Figura 3:</b> Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres. ....	26
<b>Figura 4:</b> Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno (DMBA).....	57
<b>Figura 5:</b> Disposición del colesterol en las membranas biológicas .....	66
<b>Figura 6:</b> Modificaciones post-traduccionales de Flotilina-1 y Flotilina-2 y su anclaje a membrana .....	69
<b>Figura 7:</b> Dominios y unión de Caveolina-1 a la membrana plasmática .....	73
<b>Figura 8:</b> Esquema del papel dual de Caveolina-1 a lo largo del proceso tumoral.....	75
<b>Figura 9:</b> Función de los diferentes miembros de la familia Cavin.....	76
<b>Figura 10:</b> Diseño experimental .....	89
<b>Figura 11:</b> Exploraciones periódicas de los animales.....	96
<b>Figura 12:</b> Proceso de aislamiento de fracciones de membrana .....	99
<b>Figura 13:</b> Imagen representativa de las rectas de regresión obtenidas para cuantificar los lípidos de membrana .....	104
<b>Figura 14:</b> Evolución (A) y coeficiente de variación (B) ponderales .....	114
<b>Figura 15:</b> Análisis del grado de malignidad de los adenocarcinomas mamarios experimentales mediante la escala <i>Scarff-Bloom-Richardson</i> adaptada a la rata (A y B) e imágenes histopatológicas representativas (C) .....	117
<b>Figura 16:</b> Parámetros de la carcinogénesis .....	121
<b>Figura 17:</b> Análisis por <i>Western Blot</i> de los marcadores de membrana soluble Receptor de Transferrina y Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa $\alpha$ 1 .....	123
<b>Figura 18:</b> Caracterización del contenido en proteínas totales de las fracciones de membrana en hígado .....	124
<b>Figura 19:</b> Caracterización de la expresión de proteínas marcadoras de las fracciones de membrana en hígado.....	124
<b>Figura 20:</b> Caracterización del contenido en colesterol de las fracciones de membrana en hígado .....	125
<b>Figura 21:</b> Caracterización del contenido en proteínas totales de las fracciones de membrana de los adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales .....	126
<b>Figura 22:</b> Caracterización de la expresión de proteínas específicas de dominios de membrana de los adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales .....	127
<b>Figura 23:</b> Contenido en colesterol (A) y esfingomielina (B) de las fracciones de membrana de los adenocarcinomas mamarios.....	128
<b>Figura 24:</b> Caracterización del contenido lipídico de membrana total y sus dominios en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales .....	129

Índice de figuras

<b>Figura 25:</b> Contenido lipídico de los diferentes dominios de membrana de los adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales .....	133
<b>Figura 26:</b> Caracterización del contenido en ácidos grasos de membrana total en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales .....	134
<b>Figura 27:</b> Caracterización del contenido en ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de membrana total en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales .....	135
<b>Figura 28:</b> Caracterización del contenido en ácidos grasos de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales .....	137
<b>Figura 29:</b> Caracterización del contenido en ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) en membrana soluble de adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales .....	139
<b>Figura 30:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de Flot1 en <i>Lipid Rafts</i> de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	141
<b>Figura 31:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de Cav1 en caveolas en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	141
<b>Figura 32:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	142
<b>Figura 33:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	144
<b>Figura 34:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de <i>Lipid Rafts</i> de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	145
<b>Figura 35:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre el contenido en lípidos formadores de <i>Chol-Rafts</i> , colesterol y esfingomielina, en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	146
<b>Figura 36:</b> Efecto de los lípidos de la dieta en la ratio ceramida/esfingomielina de <i>Lipid Rafts</i> en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	147
<b>Figura 37:</b> Distribución en intervalos de los resultados obtenidos en el análisis de la composición de <i>Lipid Rafts</i> en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	148
<b>Figura 38:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de caveolas en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	151
<b>Figura 39:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre el contenido en ácidos grasos de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	152
<b>Figura 40:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de ácidos grasos saturados en membrana total de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	154
<b>Figura 41:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de ácidos grasos monoinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	155

Índice de figuras

<b>Figura 42:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos poliinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	157
<b>Figura 43:</b> Ratio ácido linoleico/ácido oleico en membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	157
<b>Figura 44:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre el contenido en ácidos grasos de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	158
<b>Figura 45:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos saturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	160
<b>Figura 46:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos monoinsaturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	161
<b>Figura 47:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos poliinsaturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	163
<b>Figura 48:</b> Ratio ácido linoleico/ácido oleico en membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	164
<b>Figura 49:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de CD95 en membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	165
<b>Figura 50:</b> Efecto del aceite de oliva virgen extra (A) y del aceite de maíz (B) sobre el contenido en Cav1 y la formación de caveolas.....	199
<b>Figura 51:</b> Efecto del aceite de oliva virgen extra (A) y del aceite de maíz (B) sobre la formación de diferentes tipos de <i>Rafts</i> y sobre las vías de señalización celular asociadas .....	202
<b>Figura 52:</b> Incorporación de MUFA n-9 y PUFA n-6 por efecto del aceite de oliva virgen extra (A) y del aceite de maíz (B), respectivamente, en diferentes dominios de la membrana .....	205
<b>Figura 53:</b> Mecanismo de acción postulado para la dieta rica en aceite de maíz .....	215
<b>Figura 54:</b> Mecanismo de acción postulado para la dieta rica en aceite de oliva virgen extra .....	217



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Composición cuantitativa de las dietas experimentales (g/100 g dieta).....	93
<b>Tabla 2:</b>	Composición en ácidos grasos de los aceites utilizados en las diferentes dietas experimentales determinada por cromatografía de gases.....	94
<b>Tabla 3:</b>	Anticuerpos utilizados y condiciones de los ensayos <i>Western Blot</i> .....	101
<b>Tabla 4:</b>	Recta estándar utilizada para cuantificar los lípidos separados por cromatografía en capa fina.....	105
<b>Tabla 5:</b>	Solventes utilizados en la cromatografía en capa fina .....	106
<b>Tabla 6:</b>	Condiciones de temperatura cromatográfica.....	107
<b>Tabla 7:</b>	Ácidos grasos analizados en el estudio .....	108
<b>Tabla 8:</b>	Estudio de la evolución ponderal.....	114
<b>Tabla 9:</b>	Patología mamaria .....	115
<b>Tabla 10:</b>	Características histopatológicas de los adenocarcinomas de los diferentes grupos experimentales .....	116
<b>Tabla 11:</b>	Análisis del tiempo medio de latencia de los adenocarcinomas de los diferentes grupos experimentales .....	118
<b>Tabla 12:</b>	Estudio temporal y en el sacrificio de la incidencia de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	119
<b>Tabla 13:</b>	Estudio temporal del contenido tumoral.....	120
<b>Tabla 14:</b>	Estudio temporal del volumen tumoral total.....	122
<b>Tabla 15:</b>	Análisis estadístico de las diferencias en el contenido lipídico de membrana total y sus dominios en adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales .....	130
<b>Tabla 16:</b>	Análisis estadístico de las diferencias en el contenido en ácidos grasos de la membrana total en adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales .....	136
<b>Tabla 17:</b>	Análisis estadístico de las diferencias en el contenido en ácidos grasos de la membrana soluble en adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales .....	138
<b>Tabla 18:</b>	Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	143
<b>Tabla 19:</b>	Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales.....	143
<b>Tabla 20:</b>	Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de <i>Lipid Rafts</i> en adenocarcinomas mamarios experimentales.....	146
<b>Tabla 21:</b>	Distribución en intervalos de los resultados obtenidos en el análisis de la composición de <i>Lipid Rafts</i> en adenocarcinomas mamarios experimentales.....	149
<b>Tabla 22:</b>	Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de caveolas en adenocarcinomas mamarios experimentales.....	150

*Índice de tablas*

<b>Tabla 23:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos saturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	153
<b>Tabla 24:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos monoinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	155
<b>Tabla 25:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de PUFA n-6 de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.....	156
<b>Tabla 26:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos poliinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	156
<b>Tabla 27:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos saturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales .....	159
<b>Tabla 28:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos monoinsaturados de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	161
<b>Tabla 29:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de PUFA n-6 de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	162
<b>Tabla 30:</b> Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos poliinsaturados de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales .....	163
<b>Tabla 31:</b> Correlación entre los niveles de Col (A) o Col y SM (B) y los niveles de Cav1 .....	166
<b>Tabla 32:</b> Correlación entre los niveles de Col (A) o Col y SM (B) y los niveles de Cer .....	166
<b>Tabla 33:</b> Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y Col (A) o Col y SM (B) .....	167
<b>Tabla 34:</b> Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y Cav1 .....	167
<b>Tabla 35:</b> Correlación entre los niveles de MUFA en membrana total y Col (A) o Col y SM (B) .....	168
<b>Tabla 36:</b> Correlación entre los niveles de MUFA en membrana total y Cav1 .....	168
<b>Tabla 37:</b> Correlación entre los niveles de PUFA en membrana total y Col (A) o Col y SM (B) .....	169
<b>Tabla 38:</b> Correlación entre los niveles de PUFA en membrana total y Cav1 .....	169
<b>Tabla 39:</b> Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y los niveles de Cer (A) y Cer/SM (B).....	170
<b>Tabla 40:</b> Correlación entre los niveles de CD95 y SFA en membrana total .....	170
<b>Tabla 41:</b> Correlación entre los niveles de CD95 y MUFA en membrana total.....	170
<b>Tabla 42:</b> Correlación entre los niveles de CD95 y PUFA en membrana total .....	171
<b>Tabla 43:</b> Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y Cav1 .....	171
<b>Tabla 44:</b> Correlación entre la ratio Cer/SM de en LR y SFA en membrana total.....	172

Índice de tablas

<b>Tabla 45:</b>	Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y MUFA en membrana total .....	172
<b>Tabla 46:</b>	Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y PUFA en membrana total .....	172
<b>Tabla 47:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de Cav1 .....	173
<b>Tabla 48:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de SFA en membrana total .....	173
<b>Tabla 49:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de MUFA en membrana total .....	174
<b>Tabla 50:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de PUFA en membrana total .....	174
<b>Tabla 51:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y Col (A) o índice de activación de p21Ras y Col (B) .....	175
<b>Tabla 52:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y Cav1(A) o índice de activación de p21Ras y Cav1 (B).....	175
<b>Tabla 53:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y SFA en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y SFA en membrana total (B).....	176
<b>Tabla 54:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y ácido palmítico en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y ácido palmítico en membrana total (B).....	177
<b>Tabla 55:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y MUFA en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y MUFA en membrana total (B).....	177
<b>Tabla 56:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y PUFA en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y PUFA en membrana total (B).....	178



## ÍNDICE DE FIGURAS DEL ANEXO

<b>Anexo Figura 1:</b>	Asociación entre parámetros clínicos, bioquímicos y moleculares.....	255
<b>I:</b>	Correlación entre los niveles de colesterol y los niveles de Cav1 .....	255
<b>II:</b>	Correlación entre los niveles de colesterol y esfingomielina y los niveles de Cav1 .....	255
<b>III:</b>	Correlación entre los niveles de colesterol y los niveles de ceramida.....	255
<b>IV:</b>	Correlación entre los niveles de colesterol y esfingomielina y los niveles de ceramida .....	256
<b>V:</b>	Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y colesterol .....	256
<b>VI:</b>	Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y colesterol y esfingomielina .....	256
<b>VII:</b>	Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y Cav1 .....	257
<b>VIII:</b>	Correlación entre los niveles de MUFA de membrana total y colesterol .....	257
<b>IX:</b>	Correlación entre los niveles de MUFA de membrana total y colesterol y esfingomielina .....	257
<b>X:</b>	Correlación entre los niveles de MUFA de membrana total y Cav1 .....	258
<b>XI:</b>	Correlación entre los niveles de PUFA de membrana total y colesterol .....	258
<b>XII:</b>	Correlación entre los niveles de PUFA de membrana total y colesterol y esfingomielina .....	258
<b>XIII:</b>	Correlación entre los niveles de PUFA de membrana total y Cav1.....	259
<b>XIV:</b>	Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y ceramida .....	259
<b>XV:</b>	Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y la ratio Cer/SM.....	259
<b>XVI:</b>	Correlación entre los niveles de CD95 de membrana total y SFA de membrana total .....	260
<b>XVII:</b>	Correlación entre los niveles de CD95 de membrana total y MUFA de membrana total .....	260
<b>XVIII:</b>	Correlación entre los niveles de CD95 de membrana total y PUFA de membrana total .....	260
<b>XIX:</b>	Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y Cav1 .....	261
<b>XX:</b>	Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y SFA de membrana total.....	261
<b>XXI:</b>	Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y MUFA de membrana total.....	261
<b>XXII:</b>	Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y PUFA de membrana total .....	262
<b>XXIII:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y Cav1 .....	262
<b>XXIV:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) SFA de membrana total .....	262
<b>XXV:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y MUFA de membrana total.....	263
<b>XXVI:</b>	Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y PUFA de membrana total .....	263
<b>XXVII:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y colesterol .....	263
<b>XXVIII:</b>	Correlación entre el índice de activación de p21Ras y colesterol .....	264
<b>XXIX:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y Cav1 .....	264

Índice de figuras del anexo

<b>XXX:</b>	Correlación entre el índice de activación de p21Ras y Cav1 .....	264
<b>XXXI:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP SFA de membrana total .....	265
<b>XXXII:</b>	Correlación entre el índice de activación de p21Ras y SFA de membrana total .....	265
<b>XXXIII:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y ácido palmítico de membrana total .....	265
<b>XXXIV:</b>	Correlación entre el índice de activación de p21Ras y ácido palmítico de membrana total .....	266
<b>XXXV:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y MUFA de membrana total .....	266
<b>XXXVI:</b>	Correlación entre el índice de activación de p21Ras y MUFA de membrana total .....	266
<b>XXXVII:</b>	Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP de membrana y PUFA de membrana total .....	267
<b>XXXVIII:</b>	Correlación entre el índice de activación de p21Ras y PUFA de membrana total .....	267

<b>Anexo Figura 2:</b>	Imagen representativa del cromatograma obtenido en el análisis del contenido en ácidos grasos en LR.....	268
------------------------	--	-----

## ABREVIATURAS

C	Grupo control de dieta normolipídica
M	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz
O	Grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra
Dieta m3	Dieta experimental normolipídica
Dieta M20	Dieta experimental hiperlipídica de aceite de maíz
Dieta mO20	Dieta experimental hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra
8-oxo-dG	<i>7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine</i>
ABs	Yemas alverolares ( <i>Alveolar Buds</i> )
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
Cav1	Caveolina-1
Cav2	Caveolina-2
Cav3	Caveolina-3
Cer	Ceramida
<i>Cer-Rafts</i>	Balsas lipídicas enriquecidas en ceramida
<i>Chol-Rafts</i>	Balsas lipídicas enriquecidas en colesterol
Col	Colesterol
COXs	Ciclooxigenasas
CLA	Ácido linoleico conjugado
CSD	Dominio de anclaje de caveolina ( <i>Caveolin Scaffolding Domain</i> )
C-ter	C-terminal
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DISC	<i>Death inducing signalling complex</i>
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DRMs	Membranas resistentes a detergentes
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal growth factor</i> )
EHD2	<i>Eps-15 Homology Domain-containing protein 2</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FC	Formiato de colesterol
FFA	Ácidos grasos libres ( <i>Free fatty acids</i> )
FGFs	Factores de crecimiento de fibroblastos ( <i>Fibroblast growth factors</i> )
Flot1	Flotilina 1
Flot2	Flotilina 2
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
GSH	Glutación
GSTs	Glutación S-transferasas
HVR	Región hipervariable
LD	Gotas lipídicas ( <i>Lipid Droplets</i> )
<i>ld</i>	<i>liquid disordered</i>
<i>lo</i>	<i>liquid ordered</i>
LPC	Lisofosfatidilcolina
LR	Balsas lipídicas ( <i>Lipid Rafts</i> )
MS	Membrana soluble
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados

Abreviaturas

MURC	<i>Muscle related coiled-coil protein</i>
NATs	N-acetiltransferasas
NOS	Óxido nítrico sintasa
OEA	Oleiletanolamida
Pacsin2	<i>Protein kinase C and casein kinase substate in neurons protein 2</i>
PAHs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos ( <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> )
PC	Fosfatidilcolina
PDFG	Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>Platelet derived growth factor</i> )
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PHB	Dominio de homología a prohibitina
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PS	Fosfatidilserina
PTFR	<i>Polymerase I and transcript release factor</i>
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Rb	Retinoblastoma
RE	Receptor hormonal de estrógenos
ROS	Especies oxígeno reactivas ( <i>Reactive oxygen species</i> )
RP	Receptor hormonal de progesterona
SBR11	Escala <i>Scarff-Bloom-Richardson</i> adaptada a la rata
SDPR	<i>Serum deprivation response protein</i>
SFA	Ácidos grasos saturados
sg	<i>solid gel</i>
SM	Esfingomielina
SOD	Superóxido dismutasa
SPFH	<i>Stomatin prohibitin flotillin HflK/C</i>
SRBC	<i>Sdr-Related gene produc that binds to C-kinase</i>
SREBP	<i>Sterol-regulatory element-binding protein</i>
TAG	Triacilglicéridos
TD	Ductos terminales
TEBs	Yemas terminales ( <i>Terminal end buds</i> )
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β ( <i>Transforming growth factor β</i> )
TyrK	Tirosina quinasa
UGTs	Glucuronosiltransferasas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
XME	Enzimas metabolizadoras de xenobióticos ( <i>xenobiotic metabolizing enzymes</i> )

**Resumen**

***Abstract***

---



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 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 investigador 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 de aceite de oliva virgen extra, rico en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) n-9 y diversos compuestos bioactivos, en el cáncer de mama experimental. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si los efectos moduladores diferenciales de estas dietas, estimulador y potencialmente protector respectivamente, durante la promoción de la carcinogénesis mamaria podrían ejercerse mediante cambios en la composición de la membrana de las células tumorales. El trabajo se soporta en el modelo experimental de cáncer de mama inducido en la rata hembra Sprague-Dawley con dimetil-benz(a)-antraceno (DMBA). Con el fin de aislar los distintos dominios de la membrana, se puso a punto un método de obtención de membranas resistentes a detergentes (DRMs) en hígado y, posteriormente, se validó en los adenocarcinomas mamarios experimentales. A continuación, se caracterizó el contenido lipídico de la membrana celular tumoral para, finalmente, analizar los cambios inducidos por las diferentes dietas experimentales en el contenido tanto proteico como lipídico de la membrana y sus dominios. Los resultados mostraron que las membranas de las células tumorales mamarias son ricas en colesterol y ceramida. Además los ácidos grasos mayoritarios son saturados (SFA), seguidos de MUFA y, finalmente, PUFA. Dicha composición se vio modificada diferencial y específicamente por efecto de los lípidos de la dieta. Así, la dieta rica en aceite de maíz enriqueció la membrana en PUFA n-6, concretamente la membrana soluble, a la vez que aumentó el contenido en colesterol, sugiriendo una mayor formación de *Chol-Rafts*. Por otro lado, la dieta rica en aceite de oliva aumentó los niveles de MUFA n-9 en dominios que no correspondían a membrana soluble. Además, dicha dieta aumentó la ratio ceramida/esfingomielina, sugiriendo una mayor formación de *Cer-Rafts*, aumentó los niveles de la proteína pro-apoptótica CD95 y disminuyó los de Cav1 en caveolas. Asimismo, ambas dietas disminuyeron los niveles de ácido palmítico, especialmente la dieta rica en aceite de oliva. Estos resultados estuvieron de acuerdo con la mayor malignidad, clínica y morfológica, de los tumores de los animales alimentados con la dieta de aceite de maíz y la menor agresividad de los tumores del grupo de aceite de oliva. Además, estuvieron en línea con la disminución de los niveles de actividad de p21Ras, la *down-regulation* de la vía Akt y la inducción de la apoptosis previamente demostrada para la dieta de aceite de oliva.



### Abstract

Breast cancer is the most common malignancy among women all over the World. Besides the genetic, epigenetic and hormonal factors, there is epidemiologic and experimental evidence that nutritional factors have a role in the aetiology and the development of this disease. The dietary lipids have been directly related with cancer, mainly breast cancer. The research group has contributed to the better knowledge of the effects and the mechanisms of action of the high corn oil diets, rich in polyunsaturated fatty acids (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. The aim of this work has been to investigate whether the differentially modulatory effects of these diets, stimulatory and potentially protective respectively, on the promotion of mammary carcinogenesis could be exerted by changes in tumour cell membrane composition. This work is supported on the experimental breast cancer model induced in the female Sprague-Dawley rat with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). In order to isolate the different membrane domains, a method for obtaining detergent resistant membranes (DRMs) was standardized in rat liver and, subsequently, it was validated in experimental mammary adenocarcinomas. Next, the lipid content of tumour cell membrane was characterized and, finally, possible changes induced by the different experimental diets on the protein and lipid composition of tumour cell membrane and its different domains were analyzed. The results showed that the mammary tumour cell membranes are rich in cholesterol and ceramide. In addition, the major fatty acids are saturated (SFA), followed by MUFA and, finally, PUFA. This composition was differentially and specifically modified by the effect of dietary lipids. Thus, the high corn oil diet enriched membrane in PUFA n-6, particularly the soluble membrane, besides increasing the cholesterol content, suggesting a greater formation of *Chol-Rafts*. On the other hand, the high olive oil diet increased the MUFA n-9 levels in domains different than soluble membrane. In addition, this diet increased the sphingomyelin/ceramide ratio, suggesting an increased formation of *Cer-Raft*, and the levels of the pro-apoptotic protein CD95, and decreased the Cav1 levels in caveolae. Likewise, both diets reduced the palmitic acid content, specially the olive oil diet. These results were in agreement with the greater malignancy, both clinical and morphological, of tumours from animals fed the high corn oil diet and the lower aggressiveness of tumours from the olive oil diet group. Moreover, they were in accordance with the decreased p21Ras activity, the down-regulation of the Akt pathway and the apoptosis induction previously demonstrated for the high olive oil diet.



---

# **Introducción**

Material y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Bibliografía



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

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

### **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]).

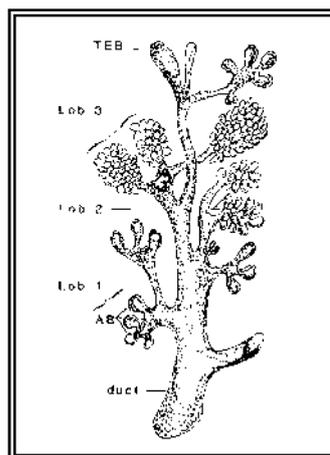
La mama humana adulta normal consta de 15-25 ductos galactóforos que drenan los lóbulos mamarios, constituidos, a su vez, por numerosos lobulillos. Los lobulillos constan de un ducto terminal intralobulillar y múltiples ductulillos rodeados por tejido conectivo intra y perilobulillar. Los ductos galactóforos 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 mamarias 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 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 1).



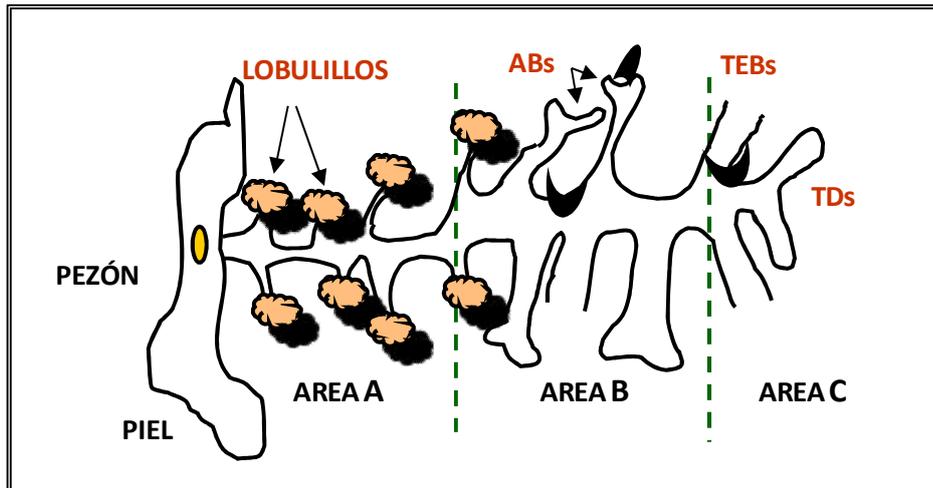
**Figura 1. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria.** Imagen de Russo&Russo [7671].

## Introducción

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 2). 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]). Éste 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 la 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 2. Topografía de la glándula mamaria de rata.**

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

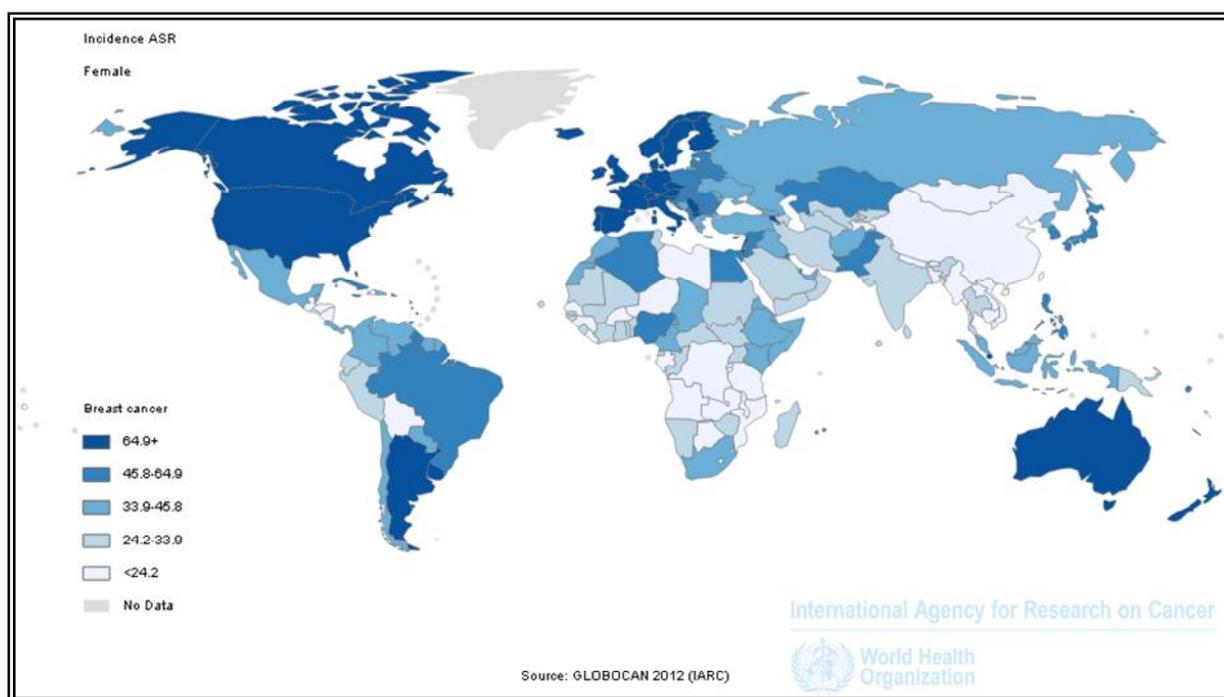
## **B. CÁNCER DE MAMA**

Existen dos grandes tipos de patología mamaria: afecciones benignas y tumores malignos. En ambos casos pueden estar localizados en cualquiera de las distintas estructuras histológicas de la mama, afectando por tanto al epitelio ductal o lobulillar y/o al estroma.

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], [8222]). 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. 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 ([6093], [7108], [8222]) (Figura 3).

En España la incidencia es más baja que en otros países de Europa, aunque también 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 las más bajas ([7673], [7674]).



**Figura 3. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres.** Globocan, 2012 ([8222]).

El cáncer de mama constituye una entidad clínica y patológica muy heterogénea, con una gran variedad de características morfológicas, moleculares, de comportamiento y de respuesta al tratamiento, lo que ha llevado a intentar delimitar grupos con valor pronóstico y predictivo que permitan un adecuado manejo de las pacientes. En cuanto a las características morfológicas, en la clasificación de las lesiones mamarias propuesta por la Organización

Mundial de la Salud (OMS), los carcinomas de mama forman parte del grupo de los tumores epiteliales, en el que se incluyen, además, las afecciones benignas, tumorales o proliferativas. Los carcinomas de mama pueden ser, a su vez, preinvasores o *in situ* e invasores ([7603]). La clasificación anatomopatológica del cáncer de mama, basada clásicamente en criterios morfológicos ([576]) se ha completado con la detección de las anomalías moleculares mediante técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ*, que permiten el estudio sobre el tumor. Los parámetros moleculares más relevantes y con valor reconocido para estratificar a las pacientes en grupos pronósticos y predictivos son los receptores hormonales de estrógenos (RE) y progesterona (RP) y p185<sup>neu</sup> o HER2, y menos establecidos, p53 y Ki67 ([7594]). Los carcinomas de mama se clasifican en hormonodependientes y hormonoindependientes, según la expresión de RE y RP, especialmente con referencia a REα.

Actualmente se considera que las variaciones en los programas transcripcionales pueden explicar, en parte, la gran diversidad del cáncer de mama y, a su vez, corresponderse con la diversidad fenotípica que exhiben estos tumores. En este sentido, estudios con *microarrays* de ADN complementario (ADNc) han permitido determinar grupos moleculares de cáncer de mama, según el patrón de genes expresados, lo cual, asociado con los conocimientos morfológicos previos ha permitido elaborar una nueva clasificación en la que se reconocen como grupos perfilados: 1) el grupo luminal A (que expresa RE y CK8/18; histológicamente suelen ser de bajo grado y responden a hormonoterapia); 2) el luminal B (con expresión de RE, pero en niveles más bajos, que característicamente muestran expresión de genes relacionados con la proliferación celular, con expresión elevada de Ki67 y expresión de CK8/18; y que histológicamente son de mayor grado, menos hormonosensibles y con peor pronóstico que el luminal A); y 3) los grupos RE negativos, que se describen como carcinomas histológicamente mal diferenciados: el *basal-like* (con ausencia de sobreexpresión de HER2, con expresión de CK5/6 y 14, que responden a quimioterapia con antraciclinas y taxanos) y el HER2+ (con amplificación y sobreexpresión de *c-erc-B2*, y que responden, además de a quimioterapia, a trastuzumab). En ambos casos, con peor pronóstico que los grupos RE+, probablemente por su alto riesgo de recaída temprana. Además, se han descrito nuevos grupos moleculares, como el apocrino (receptores de andrógenos positivos y RE-) y el *Claudin-low* [7270], [7271], [7275]).

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.

## **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 presentaran 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 co-carcinógenos, 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).

La determinación de los receptores esteroideos ha permitido clasificar los tumores mamarios, según su contenido del 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 hormonoindependientes). 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]).

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 esteroidea (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, bifenilos 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 $\beta$ /v-sis), receptores de factores de crecimiento (EGFR/v-erbB), proteínas citoplasmáticas transductoras de señales (c-Ha-ras) y factores de transcripción (c-myc, c-fos, c-jun) ([1576], [1881]). Estos genes pueden transformarse en oncogenes mediante un proceso de activación, que supone una ganancia de función en el sentido que las proteínas codificadas quedan permanentemente activadas, lejos de cualquier tipo de control, resultando en una estimulación del crecimiento excesiva o anormal ([1975], [2393], [4202]). En cambio, los genes supresores de tumores inhiben el crecimiento celular, inducen a las células a la diferenciación terminal y/o inducen la muerte celular programada o apoptosis. Por ello, las mutaciones que eliminan las funciones de estos genes facilitan la formación de tumores al liberar a las células de las restricciones normales para proliferar ([2846]). En este sentido, se habla de mutaciones con pérdida de función puesto que inactivan un componente represor de la proliferación celular ([1948]). En general, se requiere una nulicigosidad funcional para desencadenar el sobrecrecimiento celular tumoral. Ello significa que mientras exista una copia normal del gen existe función

supresora (heterocigoto para la función) y que, en cambio, la mutación de ambos alelos (simultánea o por pérdida de heterocigosidad) supone la pérdida de dicha función ([2606]). En algunos casos, la identificación de los genes supresores de tumores, como el gen del retinoblastoma (Rb) y el gen p53, ha ido ligada al estudio de los cánceres familiares donde la predisposición a padecer diferentes tipos de neoplasia se hereda como un típico carácter mendeliano autosómico ([2493]).

Las alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de éstos y, probablemente, otros genes implicados en procesos tan esenciales para la célula como la proliferación, la diferenciación o la apoptosis se hallan en la base de los mecanismos moleculares del cáncer. Hanahan D y Weinberg RA ([3973]) 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 el factor de crecimiento derivado de plaquetas -PDGF, *Platelet derived growth factor*- y el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  -TGF, *Transforming growth factor  $\alpha$* -); la alteración de la expresión y/o activación de receptores de factores de crecimiento, como EGFR y ErbB2; la alteración de algunos de los componentes de las vías de señalización intracelular mitogénica, como la vía Sos-Ras-Raf-ERK1/2, en el 30% de los tumores humanos las proteínas Ras se encuentran estructuralmente alteradas, lo que genera un flujo de señales mitogénicas hacia la célula sin necesidad de estimulación de sus reguladores *upstream*; o la inducción de la síntesis de factores de crecimiento por las células vecinas ([1576], [1881],

[5484]). Otra de las particularidades de la célula tumoral es la capacidad de evadirse de las señales antiproliferativas que en un tejido normal mantienen las células quiescentes y la homeostasis tisular. Algunas de estas señales están asociadas con componentes responsables del paso de las células por la fase G1 del ciclo celular, como la proteína Rb fosforilada (pRb), p107 y p130; y con la diferenciación, como el factor de transcripción c-myc, APC/ $\beta$ -Catenina, etc. ([3973]). Pero el cáncer no aparece necesariamente como resultado de un aumento de la tasa de proliferación celular, sino que su desarrollo depende del balance crítico entre este proceso y el de apoptosis. Por tanto, la desregulación de la proliferación junto con la reducción de la apoptosis serían los fenómenos responsables de crear un “escenario” que sería necesario y a la vez suficiente para el desarrollo del cáncer ([4061], [5576]).

La adquisición de las capacidades de autonomía, insensibilidad a factores antiproliferativos y resistencia a apoptosis conduce a la célula a un crecimiento independiente del medio. Pero para un crecimiento ilimitado es necesaria la evasión de la senescencia 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<sup>+</sup> y las células NK (*natural killer*) o secretando factores inmunosupresores como el TGF $\beta$  ([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 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular endothelial growth factor*) y/o factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs, *Fibroblast growth factors*), o disminuyendo la expresión de inhibidores endógenos como la trombospondina-1 y el interferon- $\beta$  ([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,  $\beta$ -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 G<sub>2</sub> después de un daño en el ADN y son deficientes en la reparación acoplada a la transcripción. BRCA1 es parte del complejo RAD50-MRE11-p95, componente esencial de la reparación mediada por recombinación de las roturas del ADN de doble cadena ([4534], [4623]). En general, las mutaciones de pérdida de función de BRCA1 confieren un riesgo del 83% de desarrollar cáncer de mama y del 63% de cáncer de ovario antes de los 70 años ([2586], [2845]). Las mutaciones en BRCA2 se caracterizan por su asociación con un elevado riesgo de cáncer mamario en hombres ([2586], [7687]). El hecho de que las mutaciones en estos dos genes confieran en los hombres grados diferentes de riesgo de padecer cáncer de mama hace pensar en que puedan estar regulados por hormonas sexuales ([2586]). BRCA1 puede 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, tal y como ya se ha citado, 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 cáncer 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 C 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 indicado, numerosos estudios epidemiológicos y, fundamentalmente, experimentales han puesto de manifiesto la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. En general, los PUFA de la familia n-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n6), presentes en aceites vegetales, son los principales estimuladores de la carcinogénesis ([1358],

[3568], [3672], [4324]). Es de destacar el ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3n6) 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 inhibitor del cáncer de mama ([2949], [3205]). Además, éste presenta propiedades antidiabéticas, anticancerígenas y antioxidantes ([4538], [4543]). Por otro lado, los PUFA de la familia n-3, fundamentalmente el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n3), y los de cadena larga, de origen marino, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n3), 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 polinsaturadas de origen vegetal, y además, podrían actuar como cocarcinógenos 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 (MUFA), fundamentalmente el ácido oleico (18:1n9), 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 n6/PUFA n3), 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 pudieran 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) el sistema inmunitario, 7) el estrés oxidativo y 8) el metabolismo de xenobióticos. Probablemente, *in vivo*, los lípidos actúen a través de todos estos mecanismos de una forma integrada, simultánea y/o secuencial.

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

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]). Diversos estudios han determinado que la oxitocina es el regulador central de la saciedad unido a OEA. En este sentido, el grupo investigador ha demostrado que el aceite de oliva virgen extra, con su alto contenido en ácido oleico, a través de la regulación de la oxitocina por parte de OEA contribuye a la regulación del peso corporal en ratas ([8448]).

## **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 en el desarrollo del cáncer de mama ya que es una patología hormonodependiente. Así, la alteración del metabolismo de los estrógenos es un posible mecanismo a través del cual los lípidos de la dieta podrían modificar el proceso carcinogénico mamario. 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 aromatasas P450. Esta enzima ha sido hallada en tejido mamario adiposo y tumoral ([824], [7689]). En el grupo de mujeres post-menopáusicas el tejido adiposo se convierte en la principal fuente de estrógenos procedentes de dicha actividad aromatasas ([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 n6 pueden aumentar la estrogenicidad a tres niveles: 1) por desplazamiento de los estrógenos de su proteína transportadora, incrementando los niveles de hormona libre; 2) aumentando la afinidad por su receptor; y 3) inhibiendo la actividad de la enzima 17 $\beta$ -deshidrogenasa e impidiendo, de esta forma, el paso de estradiol a estrona ([976], [3421], [3568]). Además, un incremento en el consumo de EPA, a través de la ingesta de pescado, disminuye la formación de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), un metabolito del ácido araquidónico que estimula la actividad de la aromatasas 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 n6 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 (SFA) y MUFA dentro de un amplio rango de variación en la dieta de estos ácidos grasos. En cambio, la composición de la membrana es más sensible a los niveles de PUFA n6 y n3 de la dieta, especialmente a los PUFA n3 y a la ratio n3/n6 ([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 n6 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 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, fosfolipasa citidiltransferasa, PKC (Proteína quinasa C) y PLC (Fosfolipasa C), son comúnmente reguladas por anfitropismo

([4804]). Por otra parte, varias proteínas de la matriz extracelular y del citoesqueleto, como vinculina,  $\alpha$ -actinina, profilina y gelsolina, pueden interactuar con fosfolípidos de membrana, regulando procesos fundamentales como la división, migración, adhesión celular, cambio de forma o interacciones célula-célula ([2613], [2614]).

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

Por otra parte, 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  $n6$  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]).

También 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* (LR), y las caveolas ([5449], [5451], [6336]). Dichos dominios tienen una composición característica tanto de lípidos como de proteínas, de manera que cambios en su organización pueden conducir a una desregulación de la propia célula. Dichos efectos serán tratados detalladamente en el subapartado E de este capítulo.

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

Los lípidos de membrana, por la acción de varias fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD) activadas por complejos agonista-receptor, pueden generar gran cantidad de moléculas bioactivas que actúan como segundos mensajeros o como moduladores en las cascadas de señalización intracelular ([2789], [4541]). Entre ellas, inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (*free fatty acids*, FFA) que activan 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 fisico-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 n3, en comparación con los PUFA n6, 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 PUFA n6 reducirían la duración del ciclo celular, mientras que los PUFA n3 inhibirían el crecimiento tumoral mamario ([3114], [3185], [3581],

[4542]), y los MUFA n9, 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 (n6), vía ácido araquidónico, y los derivados del ácido linolénico (n3), vía EPA ([3185]), que muestran diferentes efectos, en algunos casos, contrarios ([2050]). PGE<sub>2</sub>, producto del ácido araquidónico, promovería la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular, y potenciaría la progresión tumoral, 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 PUFA 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 PUFA 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 n3 y n6 inhiben la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de ácidos grasos, mientras que los SFA y los MUFA no tienen tal efecto ([2422], [2549], [2617]). Se ha descrito que la 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, existen 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 n3 mostraron cambios en la expresión de genes implicados en apoptosis, señalización intercelular, comunicación celular, metabolismo o interacción con patógenos. En cambio, tal efecto no fue observado en el caso de los PUFA n6 ([7154]). Por otra parte, la administración de ácido linoleico a células tumorales mamarias indujo cambios en la expresión del RE  $\alpha$ , la proteína G G13a, la p38 MAPK, así como de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la transcripción del ARN ([4542]). 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  $\alpha$ , el del ácido retinoico (RX) tipo  $\alpha$  y el receptor nuclear hepático 4 (HNF-4) tipo  $\alpha$ . Igualmente, los ácidos grasos pueden actuar alterando la actividad o la abundancia nuclear de los factores de transcripción sin necesidad de unirse a ellos, como es el caso de NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), SREBP (*sterol-regulatory element-binding protein*), c/EBP $\beta$  (*CCAAT/enhancer-binding protein B*) y HIP-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ) ([4541], [4543]).

Resultados propios del grupo de investigación demostraron que una 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  $\beta$ -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 n6 en la 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 n3 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 VEGF, PDGF, el de fibroblastos (FGF), COX-2, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), metaloproteasas de matriz (MMPs) y  $\beta$ -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 dichos genes por los lípidos de la dieta, así como la expresión de PPAR $\alpha$  ([4743]).

En los últimos años, con la irrupción 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 n6:  $\alpha$ -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) ([2385]). La regulación a la baja de estos genes en los adenocarcinomas 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  $n6$  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 NF $\kappa$ B 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 n6 generan eicosanoides con efectos proinflamatorios, mientras que los PUFA n3 son precursores de eicosanoides con efectos antiinflamatorios ([4546], [4547]). Por lo tanto, las dietas con una proporción de PUFA n6:n3 alta probablemente incrementan la generación de eicosanoides inflamatorios, mientras que dietas con una proporción baja de n6:n3 decrecerán su producción ([4541]). Es probable que las prostaglandinas estén implicadas en el efecto inmunosupresor de los lípidos ([921]). Por ejemplo, la PGE<sub>2</sub> inhibe a macrófagos, células T y B, y estimula las células inmunosupresoras ([2085], [4155], [4547]), además de inhibir la producción de algunas citoquinas, como interleucina (IL) 2 o interferón- $\gamma$ , y de estimular la de otras, como IL-4, IL-5 y IL-10. Por otro lado, se ha observado una inhibición de la proliferación de linfocitos *in vitro*, una disminución en la secreción de TNF, 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 n3 ([4547]). Algunos receptores nucleares podrían ser los candidatos a mediar estos efectos sobre el sistema inmune. Así, la activación de PPARs por los ácidos grasos suprime la expresión de citoquinas y otras moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria ([4155]).

Los estudios sobre los efectos del aceite de oliva en el sistema inmune son escasos, pero los datos disponibles indican que éste podría ser un potente mediador de la respuesta inmune y que podría modificar la producción inflamatoria de citoquinas. La atenuación de estos procesos que provoca el aceite de oliva podría explicar los efectos beneficiosos sobre el riesgo del cáncer ([4300]). Se ha demostrado que el ácido oleico tiene efectos anti-inflamatorios ([4992]). Además, algunos fenoles del aceite de oliva virgen extra pueden inhibir la producción de eicosanoides y citoquinas inflamatorios *in vitro* e *in vivo* ([4765], [4972], [6526]). En ratas, se ha observado que la ingesta materna de una dieta con 15% de aceite de oliva tiene un efecto inhibitor 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 el ADN, las proteínas y los lípidos inducido por 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, inducción de vías de transducción de señales, errores en la replicación o 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-dihydro-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 el 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. En relación a la capacidad antioxidante no enzimática, 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 bajos niveles de GSH con 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 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 sobretodo de los diferentes tipos de ácidos grasos ([3339], [6141]). Entre ellos, los PUFA n3 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 n6, supone un aumento del estrés oxidativo que podría afectar a las enzimas antioxidantes disminuyendo su nivel de actividad ([6753]). En cambio, se ha descrito que los polifenoles de origen dietético podrían favorecer el aumento de los niveles de GSH a través de la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa, puesto que se han encontrado regiones de elementos de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora del gen ([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, así como la influencia de diferentes compuestos 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]). Respecto al cáncer de mama, se ha descrito 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]).

## **8. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS**

Los xenobióticos son un amplio y heterogéneo grupo de compuestos químicos externos al organismo que requieren ser metabolizados para poder eliminarse ([7190]). Aunque no todos los xenobióticos representan un riesgo para la salud, 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 ([4874], [8140]).

El metabolismo de xenobióticos consta de dos fases. En la primera, las reacciones llevadas a cabo producen la activación hacia compuestos más reactivos, y en la segunda tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas que aumentan la hidrosolubilidad de los compuestos originariamente lipofílicos y favorecen su excreción, además de reducir su capacidad reactiva ([8139], [8149]). El principal órgano metabolizador de xenobióticos es el hígado, debido a la mayor concentración y diversidad de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (*xenobiotic metabolizing enzymes*, XMEs) seguido del intestino, el pulmón, el riñón o la piel ([8069], [8149]). Entre las XMEs implicadas en el metabolismo de fase I se encuentran mono-oxigenasas de la familia de los CYPs, que representan entre el 70-80% de estas enzimas, además de otras como oxido-reductasas, epóxidohidrolasas y peroxidasas. La superfamilia de los CYPs es un grupo de hemoproteínas catalíticas, entre las cuales las familias CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 y CYP7 son las principalmente involucradas en el metabolismo hepático y extrahepático de los xenobióticos ([8069], [8139], [8149]). Los CYPs son capaces de metabolizar un gran número de sustratos debido a su baja especificidad, ya que existen múltiples formas de la enzima, cada una de las cuales está adaptada al metabolismo de grupos compuestos relacionados estructuralmente ([8069]). Por otra parte, las principales reacciones que se encuentran en la fase II son glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación con glutatión y/o con aminoácidos. Las principales familias de enzimas implicadas en el metabolismo de la fase II son UDP-Glucuronosiltransferasas (UGTs), Sulfotransferasas (STs), N-acetiltransferasas (NATs) y Glutatión S-transferasas (GSTs), además de algunas metiltransferasas como S-metil transferasas y O-metil transferasas. También forman parte de esta fase algunas flavoproteínas como NQO1 (*NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1*), que cataliza la reducción de compuestos

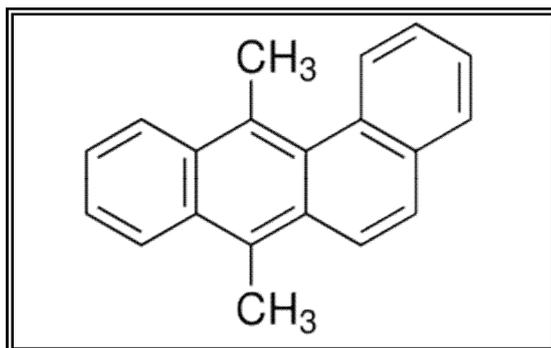
quinona hasta hidroquinonas contribuyendo a su detoxificación metabólica, sin necesidad de conjugarlos con otras sustancias endógenas. En general, las reacciones pertenecientes a la fase II se caracterizan por una alta capacidad metabólica pero por una baja afinidad por los sustratos xenobióticos.

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 *Constitutive androstane receptor* (CAR), *Pregnane X Receptor* (PXR), *Peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR), *Aryl Hydrocarbon Receptor* (Ahr) y *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-Like 2* (Nrf2), haciendo que los niveles de expresión de las XMEs puedan verse afectados por el tipo de lípidos presentes en la dieta ([6890], [7853]). Sin embargo existen muy pocos trabajos sobre la modulación de las XMEs por parte de los lípidos de la dieta y la exposición a compuestos carcinogénicos ([6722]). Entre ellos, estudios recientes del grupo investigador han demostrado el efecto diferencial que ejercen distintas dietas hiperlipídicas en la expresión y actividad hepática de las enzimas de fase I y fase II. Así, una dieta rica en PUFA n6 se ha asociado a un aumento de enzimas de fase I, mientras que una dieta rica aceite de oliva virgen extra promueve una respuesta fase I/fase II mejor coordinada ([8341],[8449]).

## **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 Sprague-Dawley sobre las que se aplica un carcinógeno químico, el DMBA (Figura 4), 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 4) es un compuesto lipofílico que forma parte de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs). Dichos compuestos se activan principalmente por las enzimas citocromo P450 (CYP). Las formas moleculares intermediarias del proceso de oxidación que catalizan son especies electrofílicas reactivas (los metabolitos carcinogénicos), capaces de interactuar con macromoléculas celulares, particularmente ácidos nucleicos y proteínas.



**Figura 4. Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA).**

Se han descrito tres vías principales de metabolización/activación del DMBA: 1) monoxigenación y formación de diol-epóxidos, 2) oxidación por transferencia de un electrón y formación de radicales catiónicos, y 3) oxidación dependiente de NADPH y formación de *o*-quinonas ([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]).

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]). Los PAHs pueden contener en su estructura una región denominada *bay* o en algunos casos una región llamada *fjord*. 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 electófilos 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]). Estudios en microsomas hepáticos de rata han determinado que para la mayoría de PAHs su metabolismo da lugar a la formación de diol-epóxidos en la región *bay* principalmente (entre el 60-90% en comparación con el resto de posibles metabolitos formados) ([2629], [6769], [7701]). En el caso de la estereoisomería del DMBA, se pueden formar cuatro enantiómeros de los diol-epóxidos de la región *bay* que a su vez pueden clasificarse en dos diastereoisómeros dependiendo de la disposición espacial de los grupos sustituyentes, como *anti*-7,12-DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido y *sin*-DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido, ambos con distinta capacidad iniciadora.

Otra de las vías metabólicas del DMBA, también catalizada por las enzimas CYPs o por enzimas con capacidad peroxidasa, consiste en la formación de radicales catiónicos que se forman a través de la pérdida de un electrón mediante una oxidación electrónica. Estos radicales catiónicos son electrofílicos con capacidad para interactuar con centros nucleofílicos de macromoléculas celulares ([4177]). La probabilidad de una molécula de PAH para perder un electrón está relacionada con varios factores, entre ellos: 1) los bajos niveles de potencial de ionización (*Ionization potencial*, IP), 2) la localización de la carga y 3) la configuración geométrica que facilite la unión covalente con centros nucleofílicos, por lo que 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 electrofílicos 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]).

Finalmente, la última vía es la formación de O-quinonas. A partir 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 manera que los dioles se oxidan hasta cetonas. Posteriormente, 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 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]).

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

## Introducción

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 es, por sus propiedades, una de las más utilizadas en las investigaciones oncológicas ([446]).

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

El momento en que se realiza la inducción es clave para la producción tumoral. La susceptibilidad de la glándula mamaria de la rata a los carcinógenos químicos depende del estado en que se encuentre el animal en el momento de la administración del carcinógeno. En general, los estudios que utilizan DMBA realizan la inducción sobre animales hembras de 50-55 días de edad, poco tiempo después de la edad media de pubertad, cuando se dan una serie de características en el animal que lo hacen más receptivo a los efectos del carcinógeno. Además, esta edad coincide con la época de mayor síntesis de ADN en la glándula mamaria, en relación también con el estado hormonal ([472]). Asimismo, se debe tener en cuenta el historial reproductivo de los animales, ya que la tasa de proliferación, y consecuentemente la cantidad de DMBA unido a ADN, es diferente según si la glándula mamaria es de una rata nulípara o múltipara. Así, las ratas vírgenes o nulíparas tienen una glándula mamaria con alto contenido en TEBs con elevada capacidad proliferativa, con una mayor captación de metabolitos reactivos del DMBA y formación de epóxidos. Además, tienen una menor capacidad para eliminar los aductos ya que la duración de la fase G1 del ciclo celular es menor. En cambio, estructuras más diferenciadas, como las AB, que predominan en la glándula mamaria de los animales preñados, se caracterizan por tener baja actividad sintética

de ADN, bajo índice mitótico, baja captación de carcinógeno, y mayor capacidad para reparar daños en el ADN ([3122], [3505]). El DMBA induce en estos animales la formación de estructuras transformadas que en lugar de diferenciarse a AB proliferan intraductalmente formando microtumores (carcinomas intraductales). Estos progresan a carcinomas invasivos, desarrollando varios patrones: cribiforme, tipo comedo o papilar. Algunos TEBs presentes en la glándula mamaria en el momento de la inducción aún se diferencian en AB, pero su número siempre es menor que en animales no inducidos. Aquellos TEBs que ya se habían transformado en estructuras más diferenciadas (AB y estructuras lobulares tempranas) antes de la administración del carcinógeno, no desarrollan carcinomas ([3122]). La observación de que los carcinomas mamarios experimentales surgen de estructuras no diferenciadas (TEBs y TD) y que las lesiones benignas, como adenomas, quistes y fibroadenomas, evolucionan de estructuras más diferenciadas, indicaría que el carcinógeno requiere de una diana estructural adecuada y que el tipo de lesión inducida es dependiente del área de la glándula mamaria afectada. Este hecho viene corroborado por la mayor incidencia de tumores localizados en las glándulas de la región torácica, que son las que mayor cantidad de TEBs poseen ([1520], [1524], [3122], [4537]).

## **E. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN CÁNCER DE MAMA: CAMBIOS EN LA MEMBRANA CELULAR**

### **1. MEMBRANA CELULAR. CARACTERÍSTICAS**

La membrana celular juega un papel importante en los procesos celulares y su composición en proteínas y lípidos se encarga de mantenerla en equilibrio. Cambios en dicha composición pueden afectar al crecimiento, la interacción con otras células y la función de proteínas y otros componentes de la misma. Existen evidencias que demuestran que los lípidos ingeridos pueden provocar cambios importantes en la estructura y funcionalidad de la membrana, y más concretamente, en los dominios que la forman ([4146],[5500],[6359],[7155],[7156],[7346]).

Cada tipo de membrana presenta una composición de proteínas y lípidos característica. Los principales lípidos estructurales de las membranas son glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico. Sus dos

## Introducción

ácidos grasos están unidos por un enlace éster al primer y segundo carbono del glicerol y un grupo de cabeza muy polar está unido por enlace fosfodiéster al tercer carbono. Su nomenclatura es según el alcohol polar en el grupo de cabeza, el cual puede estar cargado negativamente como en el caso del fosfatidilinositol (PI), positivamente como en fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), o sin carga, neutro, como sería la fosfatidilserina (PS). Dichas cargas son importantes en las propiedades superficiales de las membranas. Por otra parte, los esfingolípidos están compuestos por una molécula del aminoalcohol de cadena larga esfingosina o uno de sus derivados, una molécula de un ácido graso de cadena larga y un grupo de cabeza polar unido por enlace glucosídico o fosfodiéster. La unidad estructural fundamental en todos los esfingolípidos es la ceramida. Se pueden encontrar tres subclases de esfingolípidos: 1) las esfingomielinas, que contienen fosfocolina o fosfoetanolamina como grupo de cabeza polar y que tanto por sus características generales como estructuralmente se parecen a PC 2) los glucoesfingolípidos, que tienen un único azúcar unido a la ceramida (Cer); y 3) los gangliósidos, que son los esfingolípidos más complejos ya que contienen grupos de cabeza polares formados por oligosacáridos y una o varias unidades glucídicas terminales de ácido siálico. Finalmente, los esteroides son lípidos estructurales que se hallan presentes en la mayoría de células eucariotas. Su estructura característica es la del núcleo esteroideo que consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos con 6 carbonos y uno con 5. El núcleo esteroideo es relativamente rígido. El colesterol (Col) es el principal esteroide en los tejidos animales ([8406]).

Los lípidos de membrana son asimétricos en su distribución entre las dos monocapas, aunque no se trata de una asimetría absoluta. En la membrana plasmática ciertos lípidos se encuentran principalmente en la cara externa de la bicapa mientras que otros se encuentran en la cara citosólica (interna). A modo de ejemplo, en la membrana de los eritrocitos se encontrarían PC y esfingomielina (SM) en la cara exoplasmática de la membrana, y PE y PS, sobretodo, en la cara interna. Un gran número de flipasas y translocadores controlan estrechamente la distribución asimétrica de todos estos lípidos a lo largo de la membrana ([7569],[8405]).

Los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de membrana pueden clasificarse según su longitud y grado de saturación. Así, éstos pueden ser de cadena corta (de 4 a 6 carbonos), de cadena media (de 8 a 12 carbonos), de cadena larga (de 14 a 20 carbonos) o de cadena muy larga (más de 22 carbonos). Por otro lado, según el grado de saturación de la

cadena alquílica se distinguen SFA, sin dobles enlaces, MUFA, con un doble enlace y PUFA, con dos o más dobles enlaces. Todos ellos varían en su punto de fusión y el grado de fluidez. Consecuentemente, las características físicas de la membrana vienen determinadas por su composición en ácidos grasos.

La composición en proteínas de la membrana varía según el tipo celular. Cada proteína de membrana tiene una orientación definida en relación con el citoplasma, por lo que las propiedades de una y otra superficies de la membrana difieren mucho. Dicha asimetría, llamada lateralidad, se refleja en los diferentes tipos de proteínas presentes en la membrana: a) proteínas integrales de membrana, b) proteínas periféricas y c) proteínas ancladas a lípidos. Las proteínas integrales penetran la bicapa, son proteínas transmembrana (la cruzan por completo) por lo que tienen dominios que sobresalen por los lados extracelular y citoplásmico de la membrana. Pueden tener un sólo segmento que cruce la membrana o cruzarla varias veces. La mayoría de las proteínas integrales de la membrana funcionan como receptores que se unen con sustancias específicas en la superficie de la membrana, o como conductos o transportadores participantes en el desplazamiento de iones y solutos a través de la membrana. Este tipo de proteínas, igual que los fosfolípidos de membrana, tienen porciones hidrofílicas e hidrófobas. Por otro lado, las proteínas periféricas de membrana se sitúan completamente fuera de la bicapa, ya sea en el lado citoplásmico o el extracelular, y se relacionan con la membrana mediante enlaces no covalentes. Dichas proteínas brindan soporte estructural a la membrana y actúan como ancla para las proteínas integrales de la membrana. También pueden actuar como enzimas, cubiertas especializadas o factores que transmiten señales a través de la membrana y por lo general tienen una relación dinámica con la membrana, se atraen o se liberan de ella según las condiciones prevalentes. Asimismo, las proteínas ancladas a lípidos se localizan fuera de la bicapa lipídica, en la superficie extracelular o en la citoplásmica, pero tienen enlaces covalentes con una molécula de lípido que se encuentra dentro de la bicapa. Dentro de este grupo es posible distinguir varios tipos de proteínas: 1) proteínas ancladas a Glucosil Fosfatidil Inositol (GPI), presentes en la cara externa de la membrana plasmática y unidas a la bicapa mediante un pequeño oligosacárido complejo vinculado con la molécula de fosfatidilinositol que está sepultada en la hoja externa de la membrana; 2) proteínas presentes en el lado citoplásmico y fijadas a la membrana mediante una o más cadenas largas de hidrocarburo, como por ejemplo un grupo prenil, incrustadas en la hoja interna de la bicapa lipídica ([8404]).

## Introducción

Durante la última década el modelo clásico de mosaico fluido de membrana plasmática de Singer-Nicholson (1972) ([5476]), según el cual las proteínas difundían al azar, libre y homogéneamente en la bicapa lipídica, ha sufrido cambios. Actualmente existen evidencias que sugieren una organización lateral, con áreas de lípidos diferenciadas, debido a la incapacidad de mezclarse entre ellos a causa de impedimentos estéricos, y complejos funcionales de proteínas, tanto en la membrana plasmática como en ciertos orgánulos, de manera que se modificaría el grosor y la fluidez de la membrana ([5449],[5451],[5060]).

Según se ha descrito en un gran número de modelos, los lípidos de una membrana biológica pueden encontrarse en fase *liquid ordered* (“*lo*”), *liquid disordered* (“*ld*”) o *solid gel* (“*sg*”), en función de las interacciones entre sus cadenas hidrocarbonadas ([7424]). La fase “*lo*” está formada por moléculas de esteroides cuyas cadenas hidrocarbonadas se encuentran altamente empaquetadas entre ellas, aunque las moléculas individuales de lípidos tienen un alto grado de difusión lateral. Por el contrario, en la fase “*ld*” los lípidos se encuentran mucho menos condensados, y en la fase “*sg*” el grado de adhesión es tan alto que los lípidos permanecen inmóviles ([7012]). De acuerdo con dichos modelos, se cree que a causa del gran empaquetamiento en la fase “*lo*” los detergentes son incapaces de incorporarse a la bicapa y por lo tanto de solubilizar estas partes de la membrana, por lo que reciben el nombre de “Membranas Resistentes a Detergentes” (DRM). Esta propiedad bioquímica constituye la base de las técnicas de separación de los distintos microdominios respecto al resto de la membrana mediante ultracentrifugación en gradientes de sucrosa.

Dentro de las DRM, se encuentran los microdominios mejor caracterizados, denominados balsas lipídicas o LR. Debido a su composición, tal y como se describirá en el apartado siguiente, estas balsas lipídicas presentarían un bajo grado de fluidez pero permanecerían móviles en el plano de la membrana. Los LR están rodeados de una membrana más fluida, reconocida en la literatura como *bulk membrane* o *disordered membrane*, y en el presente trabajo como (MS), debido a su solubilidad en detergentes no iónicos, que representaría al resto de la membrana plasmática y se diferenciaría en su composición, tanto en lípidos y proteínas, de los microdominios citados anteriormente. La MS se compone mayoritariamente de fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos insaturados, y por lo tanto menos empaquetadas que los LR, y formarían parte del estado “*ld*” de la membrana ([5383]). La composición y función de las balsas lipídicas puede estar modulada por una gran variedad de factores y condiciones, y existe una correlación entre el estado físico de la membrana y el

estado fisiológico de la célula ([7509]). Existen estudios que demuestran que los LR son los dominios que sufren las modificaciones causadas por los lípidos de la dieta en la composición de membrana, especialmente por los PUFA n-3 ([5424],[5501],[5502],[5612],[6043],[7455],[7156]).

## **2. MICRODOMINIOS DE MEMBRANA: *LIPID RAFTS* Y CAVEOLAS**

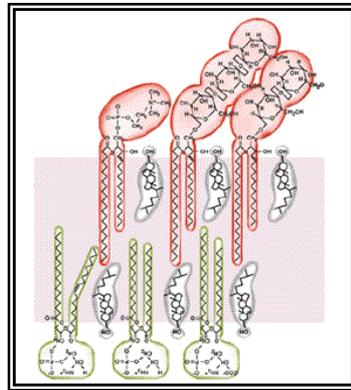
Los diferentes tipos de balsas lipídicas se clasifican en función de su composición y morfología. Así, en relación a la composición, según estudios proteómicos desarrollados en diferentes líneas celulares de cáncer, existen dos tipos de balsas en la membrana celular. Un tipo estaría enriquecido en Col y SM y gangliósidos. Serían los llamados *Chol-Rafts*. Por otra parte, existiría otro tipo de balsas enriquecidas en Cer y SM, los *Cer-Rafts*. De la relación entre estos dos tipos de balsas se hablará más adelante ([6289]).

Por otra parte, existen al menos dos variedades morfológicamente distinguibles de LR en la superficie celular: los LR no caveolares o los *Flat raft* o dominios G, y las Caveolas. Los *Flat Raft* tal y como se ha apuntado anteriormente, no son identificables por microscopia electrónica. Aunque morfológicamente *Flat Raft* y caveolas son dos estructuras de membrana diferentes, muchas veces se ha postulado que comparten una composición de lípidos y proteínas parecida. Recientemente se ha identificado la composición de los dominios caveolares y no caveolares y se ha determinado que difieren entre ellos, habiéndose concluido que la diferencia en la composición de proteínas de estas estructuras implica que también realicen funciones diferentes ([6342]).

### **2.1 *Lipid Rafts* enriquecidos en colesterol**

Los *Chol-Rafts* son los microdominios de membrana que en la literatura se denominan LR. Los LR se caracterizan por ser dominios pequeños (10-200 nm), heterogéneos, muy dinámicos, enriquecidos principalmente en esfingolípidos, Col y SFA de cadena larga, lo que permite un gran empaquetamiento entre ellos ([5448]). Debido a estas características, dichos microdominios son insolubles en detergentes no iónicos a una temperatura de +4 °C y se distinguen del resto de la membrana por presentarse como fracciones de baja densidad cuando se someten a ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa ([4216]). Existen estudios desarrollados en modelos de membrana que demuestran que el colesterol muestra una mayor afinidad por las cadenas saturadas que por las poliinsaturadas, de manera que sería el

responsable de recubrir los espacios vacíos entre los glicosfingolípidos de la bicapa y de separar los diferentes dominios ([5198]) (Figura 5).



**Figura 5. Disposición del colesterol en las membranas biológicas.**

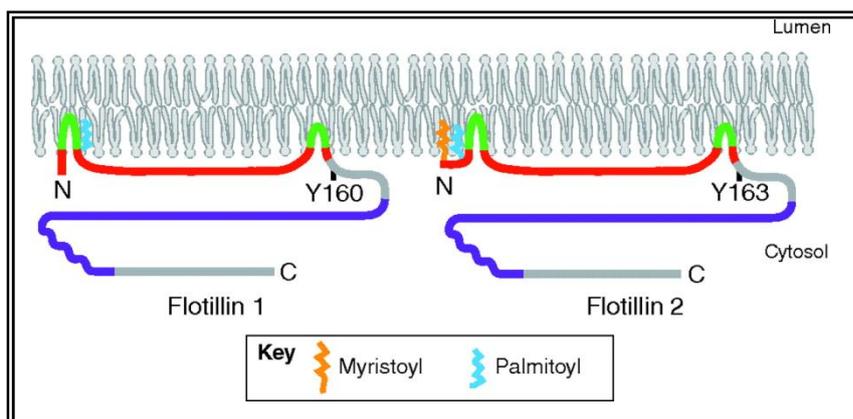
Asimismo, se especula que alteraciones en el contenido de colesterol de las células modificarían las propiedades de estos dominios ([5383]). El tratamiento de las células con agentes que eliminan el colesterol de la membrana conduce a la rotura de LR ([7509]). Por otro lado, son dominios ricos en moléculas de señalización afines a dicha composición lipídica que regulan el correcto funcionamiento de la célula ([6339],[7249]). Muchas moléculas de señalización residen o bien difunden dentro o fuera de las balsas lipídicas durante el proceso de transmisión de la señal, entre ellas EGFR, Ras, proteínas G, PI3K, diferentes isoformas de PKC e incluso eNOS ([7509]). Los LR pueden unir diferentes tipos de proteínas y el hecho de que contengan un elevado número de moléculas de señalización ha llevado a hipotetizar que estos dominios participen en una gran variedad de vías de transducción de señales que se originan en la superficie celular ([4313]). Las proteínas que se encuentran en LR suelen sufrir modificaciones post-traduccionales con lípidos de cadenas saturadas, de manera que encajen bien dentro del ambiente lipídico de los dominios. Existen 3 categorías de dichas proteínas: 1) las que se encuentran en LR constitutivamente (incluyen proteínas ancladas a GPI, proteínas doblemente aciladas como Tyr-quinasas de la familia Src, subunidad  $G\alpha$  de proteínas G y eNOS, proteínas unidas a colesterol y ancladas a palmítico, y proteínas transmembrana, particularmente las palmitoiladas); 2) las que están presentes en la membrana soluble (como el receptor de transferrina y la bomba  $Na^+/K^+$ ); y 3) las que se

encuentran en un estado intermedio moviéndose fuera y dentro de los LR con diferentes cinéticas (un ejemplo serían EGFR y H-Ras) ([6296]). En estado basal los LR son demasiado pequeños para participar en los procesos que se le asocian, de manera que pueden ser estabilizados para formar “plataformas” mayores a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido, en un proceso conocido como *raft clustering* ([5449],[5473],[5475]). Los *clustered rafts* pueden unir grupos específicos de proteínas de señalización, entre otras, sirviendo como “plataformas” para ejercer funciones relacionadas con el tráfico de membrana, la señalización y la polarización de la célula ([4818],[5466]). Además, los LR también tienen una función importante en la endocitosis, la liberación de nuevas partículas víricas y la señalización mediante receptores del sistema inmune ([6328],[5466]).

Aunque bioquímicamente estos dominios de membrana están bien caracterizados, clásicamente han existido discrepancias sobre su existencia. El hecho de no poder visualizar las balsas lipídicas en una membrana, directamente en el ambiente de la célula, y la falta de comprensión de algunas propiedades básicas (como su tamaño o vida media), ha conducido a la controversia sobre su definición y presencia. Además, probablemente sean dominios muy pequeños para poder ser identificados por microscopía óptica y electrónica. Afortunadamente hoy en día existen las técnicas de microscopía de *super resolution* que permiten la posibilidad de estudiar muestras de este rango de tamaños. Algunos ejemplos serían la *Stimulated Emission Depletion (STED) nanoscopy*, la microscopía de localización fotoactivada (PALM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM), que además de permitir una resolución espacial de nanómetros, opera en condiciones fisiológicas, sin fijación ni tinción ([8237]). Muchas observaciones han conducido a la hipótesis que la obtención en el laboratorio de las membranas celulares con detergentes no iónicos, como sería el caso del Tritón X-100, podría generar agrupaciones de lípidos y proteínas formando de esta manera balsas o dominios en fase “*lo*” que no existen en las células intactas. Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que el Tritón X-100 no induce la formación de dichos artefactos, aunque sí podría aumentar su tamaño por cohesión de dominios pre-existentes ([8236]). Este tipo de LR contendrían principalmente proteínas como Flotilina, Caveolina, CD44 y miembros de la familia de receptores Tyr-Kinasa y son los encargados de la homeostasis celular, de manera que cuando la señalización normal se desregula, los *Chol-Rafts* promueven la transformación celular, progresión tumoral, angiogénesis y metástasis.

En cuanto a las proteínas específicas de este tipo de dominios, cabe destacar Flotilina. En los años 90 se identificaron unas proteínas sobreexpresadas durante la regeneración del ganglio de la retina en peces después de una lesión en el nervio óptico a las que se les llamó Reggies (Reggie 1 y 2) ([8245]). Poco después se descubrieron dos proteínas altamente conservadas, de unos 45kDa, asociadas a la fracción de LR en tejido pulmonar de ratón a las cuales se les llamó Flotilina-1 (Flot1) y Flotilina-2 (Flot2) debido a que parecían “flotar” sobre dichos dominios y se determinó que se trataba de las proteínas Reggies ([8253]). En el contexto de este estudio se referirá a estas proteínas como Flotilinas. Son insolubles en Triton X-100 y otros detergentes no iónicos a +4°C, se consideran proteínas residentes en LR y se usan habitualmente como marcadores de estos dominios. Las Flotilinas forman parte de la familia de proteínas SPFH (*Stomatin, prohibitin, flotillin HflK/C*) ([8246]) y se encuentran presentes en todas las células de mamífero estudiadas hasta el momento ([8253],[7043]).

Flot1 (Reggie 2) y Flot2 (Reggie 1) comparten un 50% de homología en su secuencia y se ha postulado que, al menos en células en cultivo, la expresión de una regula a la de la otra ([8244]). Forman parte de una gran familia de proteínas que se caracterizan por la presencia de un dominio de homología a prohibitina (PHB). No son proteínas integrales de membrana tal y como se pensaba inicialmente, sino que debido al dominio PHB se dirigen a la membrana a través de una modificación por acilación y crean una estructura en “horquilla” que sería la responsable de insertar la proteína en la cara interna de la membrana ([8278]) (Figura 6). Flot2 está miristoilada en Gly2 y presenta una palmitoilación en Cys4, mientras que Flot1 no se miristoíla y se palmitoíla en Cys34 (modificación que se cree necesaria para su anclaje en membrana). El dominio PHB constituye el extremo N-terminal (N-ter), mientras que el C-terminal (C-ter) contiene una secuencia muy conservada en la familia que no se encuentra en otras proteínas. Flotilina puede formar homo- o heterotetrámeros a través de su región de oligomerización.



**Figura 6. Modificaciones post-traduccionales de Flotilina-1 y Flotilina-2 y su anclaje a membrana ([8278]).**

Clásicamente, Flotilina se ha considerado una proteína de andamiaje (*scaffold*) localizada tanto en *Flat Rafts* como en caveolas. Existen evidencias de estudios *in vitro* que demuestran que Flotilina y Caveolina forman complejos heterooligoméricos estables cuando co-expresan ([7043]). Por otra parte, estudios recientes sugieren que flotilina desempeña más de una función, debido sobre todo a las modificaciones post-traduccionales que sufre, que podrían hacer que interaccionara con más de una molécula de señalización y, por lo tanto, que participara en procesos vitales para la célula. Así, varios estudios han demostrado que Flotilina puede intervenir en la vía de señalización de la insulina, la activación de células T, el *trafficking* de membrana, la fagocitosis y la vía de señalización de EGFR ([8248],[8249],[8250],[8251]), e incluso puede translocar al núcleo durante la fase S y aumentar los niveles de Aurora B, de manera que induciría la proliferación celular ([7014],[8247]). Todos estos hallazgos hacen creer que son proteínas con una amplia y dinámica localización subcelular que depende del tipo de célula. De la misma manera, se cree que una de las funciones principales de las Flotilinas sería crear una vía de endocitosis independiente de las vesículas recubiertas de clatrina y de caveolas, tal y como se ha demostrado en cultivos de células Hela, presentando así un papel activo en dicho proceso ([6046]). Por otro lado, Lin et al. 2011 demostraron que un aumento en la expresión de Flot1 correlaciona significativamente con el estado clínico y con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama ([8264]). Se ha observado una regulación a la alza en células y tejido de cáncer de mama, lo que hace suponer que las Flotilinas puedan iniciar una transducción de señales a través de la unión a receptores quinasa residentes en la membrana, por lo que células *knockout* para esta proteína reducen claramente la proliferación *in vitro* y el

crecimiento de tumores *in vivo* ([8263]). En concordancia con los hechos anteriores, existen estudios que relacionan Flotilina con la regulación de los receptores de membrana ErbB2 y ErbB3 en células de cáncer de mama, de manera que una depleción de Flotilina causaría una regulación a la baja en los receptores de membrana, sobretodo de ErbB3 y de los complejos formados entre ErbB2-ErbB3 ([8262]).

Recientemente se ha demostrado que Flotilina juega un papel activo en la vía de señalización de factores de crecimiento. A modo de ejemplo, la señalización a través de EGFR induce endocitosis de Flotilina desde la membrana plasmática hasta los endosomas tardíos, lugar en el que ambas colocalizan. Sorprendentemente, la endocitosis inducida de EGFR parece depender de la fosforilación de un residuo de Tyr (Y163) en flotilina. Estos resultados parecen indicar la posibilidad que Flotilina forme parte de la endocitosis mediada por las balsas lipídicas y de la señalización de EGFR donde, por otro lado, también estarían involucradas las Src quinasas ([8277],[8279]). Además, Flotilina parece intervenir en la regulación del citoesqueleto de actina, ya que una sobreexpresión de la proteína induce la formación de filipodios y promueve el potencial invasor de células de melanoma ([7040]).

## **2.2 Caveolas**

Las caveolas, un subtipo de LR ricos en colesterol, son invaginaciones de membrana, generalmente en forma de matraz (*flask shaped*) de 50-100 nm que se encuentran en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares. Se forman a partir del reclutamiento de la proteína integral de membrana Caveolina, su proteína de “andamiaje”, necesaria para su formación, por afinidad con el colesterol de estos dominios ([4914],[5449],[5474],[5479]). Fueron identificadas morfológicamente en los años 50 por Palade y Yamada y se denominaron “vesículas del plasmalema” ([5478],[8025]). Pueden adoptar diferentes morfologías en función del tejido donde se encuentran, como por ejemplo racimos, típicos en células musculares en desarrollo, rosetas en adipocitos, tubulares en células endoteliales e incluso canales transcelulares ([5447]). El número y la morfología de las caveolas varía en función del tipo y del estado celular, por lo que los niveles de Caveolina no necesariamente correlacionan con el número de caveolas cuando se comparan diferentes tejidos que expresan contenidos similares de Caveolina ([5428]). Aunque LR y caveolas comparten ciertas propiedades bioquímicas, la localización de Caveolina y proteínas de la familia Cavin en estas últimas diferencia ambos dominios, por lo que son proteínas que sirven como marcadores selectivos para caveolas. En resumen, las caveolas representan microdominios especializados

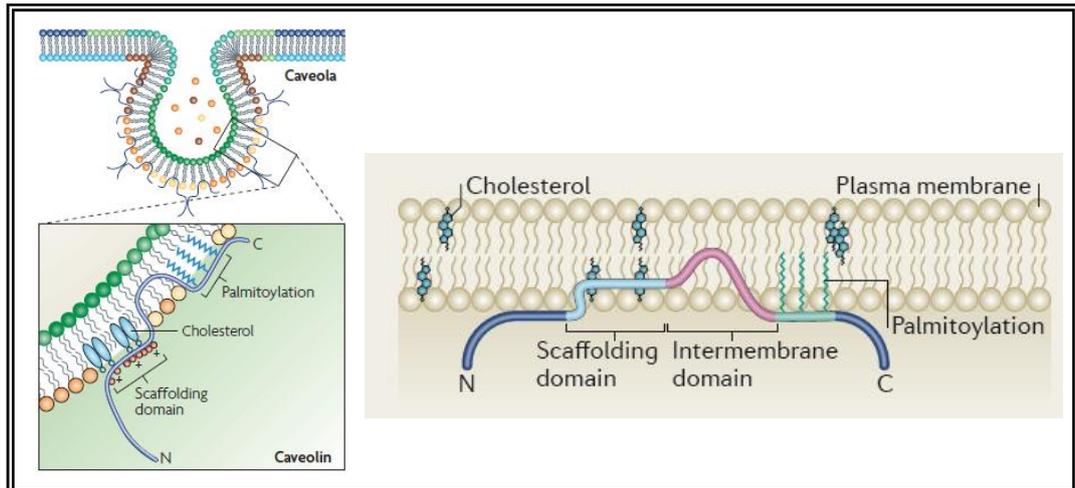
y morfológicamente diferentes a LR, enriquecidos en colesterol y esfingomiélin, que se estabilizan por las proteínas Caveolina y Cavin, entre otras ([6408]). En el microscopio electrónico de transferencia las caveolas se observan como vesículas sin recubrimiento y lisas, fácilmente diferenciables de las vesículas recubiertas de clatrina ([6355]).

Entre sus funciones se encuentran la endocitosis, la transcitosis o la transducción de señales. En los años 70 la observación que las caveolas existían como invaginaciones de la membrana plasmática, formando así vesículas, individuales o agregadas, permitió a los investigadores creer que estas estructuras intervenían en la endocitosis de macromoléculas ([8280]). Posteriormente, se demostró con microscopios de alta resolución que las células usaban las caveolas para incorporar tanto moléculas pequeñas (como el folato) como proteínas mayores (como albúmina o fosfatasa alcalina). Por otra parte, las caveolas están muy enriquecidas en colesterol en comparación con el resto de la membrana plasmática y Caveolina se une a colesterol con una gran afinidad (se cree que en relación 1:1) ([5719]). Además, la depleción de colesterol de la membrana plasmática conduce a la pérdida morfológica de las caveolas y a la disipación de la matriz de Caveolina. Se ha sugerido que las caveolas y Caveolina están involucradas en el mantenimiento intracelular del balance de colesterol. El colesterol celular deriva de dos fuentes principales: de la producción *de novo* o del consumo extracelular como de las LDL. Una vez dentro de la célula, las Caveolinas parece que funcionan como escoltas intracelulares para el transporte del colesterol desde retículo endoplasmático hasta membrana celular, concretamente a las caveolas. Una vez repartido, el colesterol tiene 3 papeles importantes: permanecer como componente de las caveolas, rellenar los espacios del resto de la membrana plasmática o ser secretado a unidades de transporte de colesterol séricas como las HDL.

En relación a la función de las caveolas en transducción de señales, la purificación bioquímica de las caveolas y el análisis de sus componentes ha permitido determinar que algunas de las proteínas de membrana pueden localizar preferencialmente en estas estructuras ([6886]). Tal y como se ha descrito anteriormente, las caveolas están muy enriquecidas en proteínas de unión a membrana, especialmente proteínas de señalización modificadas con grupos lipídicos (H-Ras, tirosin quinasa (tyrK) de la familia src, eNOS, etc). Además, Caveolina puede unir y regular funcionalmente dichas moléculas a través del dominio *scaffold*. A menudo, los autores se han referido a estas plataformas como “signalosomas” debido al gran número de proteínas de señalización que localizan en ellas ([4319],[6886]).

Según se ha identificado recientemente y a diferencia de lo que se había creído durante años, Caveolina no es la única proteína esencial para la formación y estabilización de caveolas. Existe una familia de 4 proteínas, las Cavins, a las que clásicamente se les había adjudicado otro nombre debido a la función que se les designó en el momento de su descubrimiento. Se ha demostrado que éstas también tienen un papel fundamental en la formación de estas estructuras. Por otra parte, la presencia de EHD2 (*Eps-15 Homology Domain-Containing Prot2*) (ATPasa) y de Pacsin2 (*Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2*) también es esencial para la estabilización de dichas estructuras.

Las Caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana de 21-24 kDa y debido a que son el componente principal de las caveolas han sido su mayor foco de investigación, de igual manera que se ha considerado el mayor marcador de estas estructuras desde su descubrimiento ([7797]). Existen 3 miembros de la familia en mamíferos: Caveolina-1 (Cav1), Caveolina-2 (Cav2) y Caveolina-3 (Cav3). Cav1 y Cav2 se expresan generalmente juntas en la mayoría de células, mientras que Cav3 solamente está presente en células del músculo estriado ([6355]). Diferentes estudios realizados con ratones *knockout* demuestran que Cav1 y Cav3 son necesarias para la formación de caveolas a diferencia de Cav2 ([8258],[8259]). La formación de la caveola por parte de Cav1 y Cav3 conlleva la oligomerización y asociación de dichas proteínas con los dominios ricos en colesterol. Cav1 se asocia con 1-2 moléculas de colesterol y sufre una palmitoilación en la región C-ter ([6870]). Se considera que unas 140-150 moléculas de Caveolina están presentes en una sola estructura caveolar (Figura 7).



**Figura 7. Dominios y unión de Caveolina-1 a la membrana plasmática.**

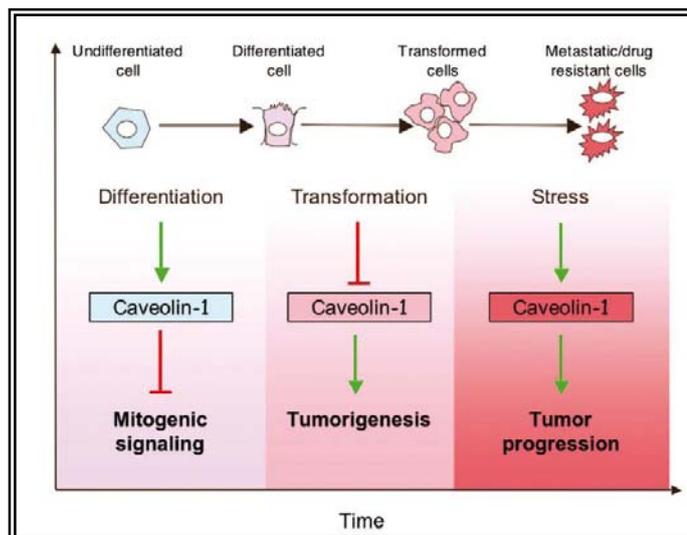
Cav1, el miembro más estudiado de la familia, es una proteína de unión a colesterol y ácidos grasos, palmitoilada y oligomérica (Figura 7). Tiene una secuencia hidrofóbica que abarca la membrana y tres lugares de palmitoilación en el dominio C-ter, que no parecen esenciales para su localización en caveolas ([6870]) pero que contribuyen a la estabilización del *hairpin loop* característico asociado a la membrana. Las caveolinas forman homo- y heterooligómeros que constituyen el recubrimiento de la caveola, de manera que los oligómeros de caveolina pueden servir como anclaje para muchas proteínas que interactúan con ella (incluidas H-Ras o EGFR). Este descubrimiento llevó a especular sobre la “Hipótesis de señalización de las caveolas” según la cual las caveolas actuarían como estructuras de membrana especializadas capaces de ensamblar y coordinar las funciones de complejos multiproteicos involucrados en transducción de señales, tráfico celular, homeostasia de lípidos y adhesión celular ([4609],[6428]). Otra característica importante de la molécula de Caveolina es su dominio *Scaffold* (CSD, *Caveolin Scaffolding Domain*), una región adyacente al dominio hidrofóbico utilizado para interactuar con moléculas de transducción de señales([8260],[8261]). Cav1 interactúa directamente con muchas moléculas de señalización a través de este dominio CSD lo que parece mantenerlas de forma inactiva. A modo de ejemplo, EGFR interactúa con Cav1 en las caveolas y rápidamente se produce una respuesta. Existe una migración fuera de las caveolas que parece ser importante para su función celular normal. Además, se ha demostrado que mutaciones en EGFR que impiden que se mueva fuera de las caveolas inducen un fenotipo oncogénico ([5627]).

## Introducción

Se han identificado 2 isoformas de Cav1:  $\alpha$  y  $\beta$ . La isoforma  $\beta$  (residuos 32-178) deriva de un inicio de traducción alternativo al de la isoforma  $\alpha$  (residuo 1-178) ([6883]). Entre las dos isoformas se detectan diferencias funcionales, como una fosforilación en Tyr de la isoforma  $\alpha$  que aparentemente provocaría una distribución diferente entre Cav1  $\alpha$  y  $\beta$  en caveolas invaginadas profundamente y otras con menos grado de invaginación que solamente contienen la forma  $\beta$  ([6882]).

En humanos, Cav1 y Cav2 colocalizan en el cromosoma 7q31.1 frecuentemente deletado en diversos cánceres. Dicho locus también puede encontrarse silenciado por metilación del promotor. En cáncer de mama, Caveolina se encuentra mutada en un 16% de los casos (P132L), por lo que clásicamente se ha sugerido que podría ejercer un papel de regulador negativo de la tumorigénesis ([5447]). Existen estudios que demuestran que dicho rol se establecería sobretodo en tejido mamario indiferenciado, ya que en ratas vírgenes los niveles de Caveolina son extremadamente altos ([6386]). De dichos estudios se desprende que la localización de Caveolina depende tanto del tipo de tejido tumoral mamario como del estado de diferenciación. Actualmente se considera que Caveolina ejerce un papel dual en cáncer, ya que en estados tempranos sus niveles suelen ser altos, de manera que mantiene inactivas a las moléculas de señalización que interaccionan con ella. Por otro lado, en estadios más avanzados se produce una desregulación que provoca que Caveolina actúe como promotora del cáncer, produciendo así una hiperactivación de las vías de señalización que anteriormente se encontraban inactivas [6357]) (Figura 8). Muchas de las proteínas localizadas en caveolas e inhibidas por Cav1 son extremadamente importantes en vías de proliferación y son anti-apoptóticas. Si funcionalmente se produce un desajuste, estas proteínas pueden dar lugar a células con ciclos hiperproliferativos y llegar a formar tumores.

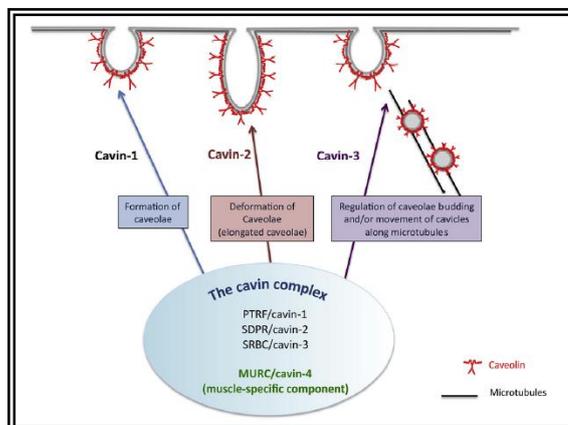
Se considera que Cav1 es importante en las células estromales en tumores sólidos, ya que un gran número de estudios demuestran que altos niveles de Cav1 en el estroma correlacionan con una baja capacidad del tumor de metastatizar ([6413]). Sin embargo, otros autores sugieren que las células estromales podrían enviar, por interacciones paracrinas, factores de crecimiento a las células del tumor las cuales serían más móviles e invasivas ([6219]).



**Figura 8.** Esquema del papel dual de Caveolina-1 a lo largo del proceso tumoral ([6357]).

En cuanto a las proteínas de la familia Cavin, el primer miembro de la familia, Cavin 1 (*PTFR, Polymerase I and Transcript Release Factor*) inicialmente se identificó como un factor que estimulaba la liberación de un pre-RNA y la Polimerasa I durante la transcripción. Posteriormente se ha demostrado que se expresa en todas las células que expresan Caveolinas y que es esencial para crear caveolas tanto *in vitro* como *in vivo*. Diferentes estudios demuestran que un ratón *knockout* para Cavin1 muestra un fenotipo muy parecido al ratón *knockout* para Cav1 y Cav3 y que los animales que no expresan Cavin1 no tienen caveolas detectables morfológicamente. Incluso se cree que puede regular la transcripción del gen de Cav1([8238]). Por otro lado, Cavin 2 (*SDPR, Serum Deprivation Response protein*) es requerida para la formación de caveolas y regula su morfología y dinámica a través de la inducción de túbulos de membrana. Cavin1 y Cavin 2 formarían un complejo proteico en el que la expresión de una regula la expresión de la otra ([8229]). Cavin3 (*SRBC, Sdr-Related Gene Product that Binds to C-kinase*) es una proteína adaptadora de Caveolina ya que inmunoprecipitan juntas y regula la función de caveolas. Pertenece a la familia de proteínas STICK (sustratos que interaccionan con C-Kinasa). Se ha demostrado que Cavin3 sigue asociada a Caveolina cuando la caveola viaja por los microtúbulos a diferentes regiones celulares y que en ausencia de esta proteína no se produce el tráfico de dichas vesículas. Tanto Cavin2 como Cavin3 tienen funciones adaptadoras, que regulan la interacción entre diferentes moléculas de señalización localizadas en varios compartimentos celulares ([8227]). Finalmente, Cavin 4 (*MURC, Muscle Related Coiled-Coil Protein*) es específica del músculo

esquelético, pero todavía se desconoce cómo interacciona con Cav3 y cómo regula la función de las caveolas en el músculo (Figura 9).



**Figura 9. Función de los diferentes miembros de la familia Cavin ([8234]).**

En cuanto a EHD2, se trata de una ATPasa que se encarga de unir las caveolas a los filamentos de actina y mantiene el balance entre las caveolas estacionarias en la membrana plasmática y las que están implicadas en transporte vesicular ([8231],[8234]) y Pacsin2/Syndapin-II que EHD2 se encarga de fijar el diámetro de las caveolas. En estudios realizados con células HeLa se ha demostrado que se encarga de esculpir la membrana después de la unión de Caveolina y que recluta Dinamina2 para la fusión de la caveola, de manera que trabaja coordinadamente con Cavin1 ([8230]).

### **2.3 Microdominios enriquecidos en colesterol y vía de señalización de p21Ras**

La ruta de p21Ras es una importante vía de señalización iniciada por los receptores tirosina quinasa ErbB y se ha relacionado a la estimulación de la proliferación celular ([5773]). Las proteínas Ras sirven como nodos de señalización activados en respuesta a diversos estímulos extracelulares. Una vez activa, dicha proteína interacciona con múltiples efectores que se encuentran *downstream*, catalíticamente distintos, que regulan las redes de señalización citoplasmáticas que controlan la expresión génica y la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula.

La superfamilia de genes *ras* codifica pequeñas proteínas de unión a GTP, que regulan muchos procesos de la célula, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, la

organización del citoesqueleto y el tráfico a la membrana ([4088]). Las GTPasas de la superfamilia Ras funcionan como interruptores moleculares regulados por el ciclo GDP/GTP. Esto significa que alternan entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP, en el que transmiten señales estimuladoras del crecimiento desde la membrana plasmática hasta el núcleo ([2390], [5486], [5516]). La localización principal de las proteínas Ras es la membrana celular, aunque también pueden hallarse en endosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi ([4138], [4304]). Las tres principales isoformas de las proteínas p21Ras que se expresan (H-ras, N-ras y K-ras4B) mantienen un alto grado de homología entre ellas (>90%) y únicamente difieren en su extremo carboxiterminal. Debido a este hecho, durante mucho tiempo se asumió que sus funciones eran redundantes, pero con el paso del tiempo y a través de la utilización de ratones *knockout* ([5493], [5494]), así como las diferencias en el tráfico a la membrana plasmática y la localización en ella de las diferentes isoformas de las proteínas Ras ([4198], [5439]), sugieren que dichas proteínas desempeñan diferentes papeles en la fisiología celular, es decir, que la señalización a través de cada una de las isoformas de p21Ras daría lugar a resultados distintos ([4198], [4307]). En la región C-terminal se distinguen la región hipervariable (HVR) que a diferencia del resto de secuencia, se conserva escasamente entre las isoformas. La HVR incluye dos secuencias señal que cooperan para localizar p21Ras en la membrana plasmática, dirigiendo su procesamiento postraduccional, el anclaje a la membrana y el tráfico de la proteína recién sintetizada y procesada desde la superficie citosólica del RE a la superficie interna de la membrana plasmática ([4198], [4610]). En el dominio C-terminal se localiza el motivo CAAX (C=cisteína, A=aminoácido alifático, X=serina o metionina) que es la primera de las secuencias señal y se modifica secuencialmente postraduccionalmente para hacerla más hidrofóbica. Dichas modificaciones comprenden, en primer lugar, la farnesilación irreversible del residuo de cisteína por parte de la enzima Farnesil Transferasa, a continuación la secuencia -AAX se elimina por proteólisis, y entonces, la cisteína que queda terminalmente, se carboximetila. El anclaje a la membrana de la proteína se completa con la segunda secuencia señal, reacción reversible que consiste en la palmitoilación de diferentes residuos de Cys en función de la isoforma. A p21K-ras4B, en lugar de un grupo palmitoil, se le añade un dominio polibásico de seis residuos de lisina ([4610], [4135], [4136]). Existen datos que sugieren que en función de las modificaciones postraduccionales que sufren las diferentes isoformas de p21Ras, ya sea palmitoilación o bien la adición de la región polibásica, podrían ser dirigidas a diferentes subdominios de la membrana plasmática ([4137], [4138], [4198], [5488],[8208])., Así, Prior IA. et al. 2003 demostraron, mediante una combinación de

técnicas bioquímicas y de microscopia confocal y electrónica, que el anclaje C-terminal de p21H-Ras dirige esta proteína hacia los LR, mientras que no sucede así para p21K-Ras ([4307]). Por otro lado, diversos autores han constatado que la señalización a través de p21H-Ras palmitoilada es altamente sensible a perturbaciones del colesterol de membrana plasmática, mientras que la señalización a través de la proteína K-Ras modificada con la adición de un dominio polibásico no lo es. Por tanto, la función de p21H-Ras es selectivamente dependiente de la integridad de los LR ([4307]). Estudios realizados por Ma DWL et al. muestran cómo la proteína H-Ras se encuentra mayoritariamente localizada en LR ([4614]). Cabe destacar el equilibrio que muestra p21H-Ras en cuanto a su localización entre los LR y la MS. En este sentido, diversos autores han estudiado el proceso de activación de la proteína, proponiendo que su interacción con las regiones de MS estaría modulada por la carga con GTP. De esta manera, p21H-Ras cargada con el nucleótido GTP se redistribuiría desde los LR a la MS por un mecanismo dependiente de la HVR, mostrando así como los estados GTP/GDP de p21H-Ras determinarían su segregación lateral en la membrana plasmática. ([4307]). La correcta modulación de la segregación lateral de esta proteína, por tanto, es crítica para la señalización que desencadena a nivel intracelular o señalización *downstream*. Estudios recientes muestran como mutaciones en p21H-Ras le impiden migrar desde LR e impiden la activación de PI3K ([8211]).

Asimismo, se ha descrito la localización de algunos de los componentes de la vía de señalización iniciada por Ras en estos microdominios de membrana. Existen estudios que demuestran que EGFR aparece concentrado, junto a p21Ras, en LR ([5456]). Se cree que dichos dominios pueden actuar como reguladores negativos de la fosforilación en los residuos tirosina de este receptor ([5628]) y que la unión al ligando y la activación del receptor conducirían a la migración de EGFR fuera de LR ([5627]). Por lo que respecta a los efectores de p21Ras, se han asociado a estos microdominios multitud de ellos como por ejemplo Akt/PKB. En estudios con células LNCaP de cáncer de próstata humano, la disrupción de LR provoca la inhibición de la fosforilación de Akt1 (y también de EGFR).

## **2.4 Lipid Rafts enriquecidos en ceramida**

Los *Cer-Rafts* o plataformas de ceramida están enriquecidos principalmente en ceramida, esfingomielina, gangliósidos y proteínas de señalización, como por ejemplo los receptores de muerte (CD95/FAS) y el intermediario entre dichos receptores y el esqueleto de actina de la célula, la proteína Ezrina. Tal y como se ha demostrado en un gran número de

estudios, las plataformas de ceramida promueven, principalmente, la apoptosis celular ([6289]). Datos actuales sobre los mecanismos de inducción de muerte celular por radiación y quimioterapia sugieren que la destrucción de la célula se da por la vía apoptótica iniciada a causa de la transformación de *Chol-Rafts* en *Cer-Rafts*, lo cual conlleva la internalización de FAS/CD95 y del complejo de muerte DISC (*Death Inducing Signalling Complex*). También se ha descrito que ciertos lípidos o moléculas lipídicas pueden ejercer un efecto similar sobre la membrana de algunas células tumorales ([8272]).

La ceramida, que se encuentra entre los lípidos más hidrofóbicos en la naturaleza, es un esfingolípido formado por esfingosina unida a un ácido graso, que contiene entre 2 y 28 átomos de carbono en su cadena, a través de un enlace ester-amida ([7433]). Constituye la “columna vertebral” hidrofóbica de todos los esfingolípidos complejos ([7509]). La ceramida se puede sintetizar *de novo* mediante la enzima ceramida sintasa, o bien se puede obtener a partir de la hidrólisis de esfingomielina celular a partir de alguna de las diferentes esfingomielinasas presentes en la célula ([8389]). La mayoría de los efectos que produce la ceramida en la célula son debidos a sus propiedades biofísicas únicas. Las fuertes interacciones entre las moléculas de este lípido dan lugar a una separación de fases en el plano de la membrana, entre dominios ricos y pobres en ceramida ([7442]). Asimismo, los esfingolípidos pueden actuar como donadores y receptores de enlaces de hidrógeno a causa de sus grupos hidroxilo y amida. Sin embargo, ceramida y esfingomielina difieren en su afinidad por otros lípidos de la membrana, como es el caso del colesterol. Así, la esfingomielina interacciona fuertemente con dicho estero por puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del C3 del colesterol y la esfingosina del esfingolípido. En cambio, ceramida tiene poca afinidad por el colesterol y tiende a separarse en microdominios exclusivos. En estudios de fuerza atómica se ha demostrado que las ceramidas de cadena larga se mezclan muy poco con el colesterol y producen una separación lateral de fases, lo que indica que la ceramida posee la habilidad de formar microdominios espontáneamente en bicapas de glicerofosfolípidos ([8276]). Además de esta separación lateral, la ceramida como lípido de membrana lleva a cabo diferentes funciones, como pueden ser la inducción de fusión o fisión de la bicapa o la formación de poros ([8268],[8269],[8270]). También se ha observado que después de la formación de ceramida en la membrana plasmática, como respuesta a estrés o por inducción de un agonista, que provoca la agregación de receptores, se produce una alteración local en la permeabilidad de la membrana que resulta en un flujo anormal de iones, como por ejemplo el calcio, que puede afectar a la actividad de enzimas locales, activando de esta manera cascadas

de señales específicas ([8268]). En resumen, la generación de ceramida en respuesta a una señal de estrés induciría cambios locales en el ambiente de la membrana que pueden afectar a la permeabilidad, la fluidez, el flujo de iones, el movimiento de proteínas dentro y fuera de las balsas lipídicas, cambios conformacionales de receptores y/o enzimas asociadas a la membrana y al movimiento de lípidos en la bicapa ([7442]).

Las balsas lipídicas ricas en colesterol y esfingomielina pueden transformarse y dar lugar a estos *Rafts* con alto contenido en ceramida. Existen estudios que confirman que después de un estímulo determinado, una pequeña parte del contenido de CD95/FAS de la membrana plasmática desencadena la translocación de una esfingomielinasa ácida (aSMasa) hacia la cara exterior de los dominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingomielina, de manera que ésta última es hidrolizada por dicha enzima obteniéndose ceramida ([7430]). Por otra parte, la ceramida se acumulará en la membrana de manera que se formarán pequeños dominios enriquecidos en este lípido que posteriormente se agruparán espontáneamente y formarán macrodominios (o “plataformas”) altamente empaquetados confiriendo una gran estabilidad a este tipo de *Rafts* ([7509]). Estas plataformas que contienen una gran cantidad de CD95 reclutan a los componentes que forman DISC y se activa la proteína caspasa8, que será la encargada de activar al resto de caspasas y desencadenar la muerte celular por apoptosis. De esta manera, las moléculas de ceramida cambian las propiedades biofísicas de los *Rafts* de membrana.

La ceramida formada por la hidrólisis de esfingomielina, desplaza el colesterol presente en las balsas lipídicas y, consecuentemente, también se produce una migración de las proteínas de unión al colesterol y palmitoiladas como es el caso de Cav1 ([7425],[7434]). Existen estudios en los que se ha evidenciado el poder protector de estos dominios ricos en ceramida frente a infecciones bacterianas de manera que se induce la muerte por apoptosis de las células infectadas e incluso se regula la respuesta por parte de ciertas citoquinas ([8274]).

CD95/FAS es una proteína de membrana de tipo I que pertenece a la familia de receptores de TNF y NGF ([8273]). En su dominio extracelular presenta dos lugares de N-glicosilación, una región rica en cisteínas, característica de dicha superfamilia, donde se une el ligando (FASL), y un dominio de muerte intracelular cercano al extremo carboxilo terminal de la molécula compuesto por 80 aminoácidos, cuya función es la de unir moléculas adaptadoras para transmitir la señal de muerte al resto de la célula ([8255],[7504]). Su principal y más conocida función en señalización es la inducción de la apoptosis por la vía

extrínseca (o de membrana) ([7567]). Los receptores CD95 se expresan en la superficie de las células como homotrímeros preasociados ([8272]). El agrupamiento e internalización del receptor se produce como resultado de la unión de CD95 con un ligando soluble, FASL, localizado sobretodo en diferentes tipos de linfocitos, aunque también se han descrito vías de activación del receptor de muerte independientemente de su ligando. La Edelfosina, un agente tumoral de naturaleza lipídica, sensibiliza las células de leucemia frente a la apoptosis a través de una inducción de la redistribución del receptor pro-apotótico CD95 hacia LR. Como consecuencia, se da una inhibición de PI3K por parte de Edelfosina, que activa la apoptosis mediada por FAS independientemente de la unión FAS/FASL ([7431]).

CD95 es un receptor de muerte quiescente que se expresa constitutivamente en la mayoría de tejidos. Una vez se ha producido la unión de CD95 y CD95L se le unen secuencialmente la molécula adaptadora FADD (MORT1), las pro-caspasas 8 y 10, y finalmente el regulador de dichas caspasas c-FLIP, para dar lugar DISC ([7503]). Como resultado de esta oligomerización se produce la activación de Caspasa8, se procesa autoproteolíticamente, y se libera la enzima heterotetramérica en el citosol dando lugar a dos posibles vías de muerte celular programada: tipo I (caspasa8 rompe y activa directamente caspasa3) o tipo II (la rotura de caspasa3 se induce directamente). Alternativamente, CD95 puede activar una forma de muerte celular independiente de caspasa y no apoptótica. Así, en células de fibrosarcoma y células T, Fas puede producir necrosis celular donde las caspasas no están involucradas ([8257]).

La mayoría de tumores humanos expresan CD95. En muchas situaciones se observa un aumento de la expresión de CD95L en tumores sólidos que cursa con una regulación a la baja de CD95, hecho que se interpreta como un “contraataque” por parte de las células tumorales contra los linfocitos infiltrados en el tumor ([8256]).

### **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 ([7329],[8086]). La dieta 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, macronutrientes 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 (isotiocinatos y organosulfurados) se les han atribuido múltiples cualidades anticarcinogénicas (revisado en [6850],[7906]). Asimismo, existen estudios que demuestran que los flavonoides interaccionan con la membrana celular, concretamente con los microdominios LR, de manera que pueden modular vías de transducción de señales ([8447]).

La actividad beneficiosa de muchos compuestos procedentes de la dieta no sólo radica en sus propiedades intrínsecas, sino también en su capacidad para activar la expresión de enzimas o vías de señalización protectoras ([7425],[7329],[8086]). 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 ([7329],[8086]). 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]).

La membrana plasmática se ha considerado una de las dianas más importantes, a parte del DNA, para muchos compuestos dietéticos y tratamientos anti-cáncer. Un gran número de estudios han propuesto las balsas lipídicas como diana para agentes terapéuticos contra el cáncer ([8267]). Según se ha demostrado en diversos estudios, los ácidos grasos de la dieta se pueden incorporar en los fosfolípidos de la membrana, de manera que crean impedimentos estéricos entre dichos fosfolípidos y el resto de lípidos. Cada ácido graso tiene afinidad por un fosfolípido concreto y de esta manera se produce una separación en dominios diferentes a los que existen en la célula en su estado normal ([5198]). A modo de ejemplo, células de cáncer de mama MDA-MB-231 tratadas con ácido docosahexaenoico (DHA) presentan una alteración en las balsas lipídicas, de manera que la incorporación del ácido graso principalmente en PE, en la cara interna de la membrana, y posteriormente en PC, en la cara externa, producen en primer lugar una separación de fase, por aversión al colesterol, en la que se forman dominios ricos en DHA y pobres en colesterol y SM (dominios no *Rafts*) y dominios ricos en Colesterol y SM (dominios *Rafts*). En segundo lugar, provocan una externalización de la PS de la cara interna de la membrana, la cual dará lugar a las primeras fases de la muerte celular programada ([5424]). Debido al gran cambio sufrido por la membrana, se alteran sus propiedades físicas, hecho que puede modificar la localización en la

membrana de un gran número de moléculas de señalización. Se cree que una gran acumulación de ácidos grasos insaturados en la cara interna de la membrana, puede potenciar el *Flip-flop* de colesterol a la cara externa produciendo así la desestabilización de estructuras y desencadenando la muerte celular. En células T de ratón los PUFA n3 remodelan los LR ([5501],[5502]) mostrando así un posible efecto de estos lípidos en los dominios de membrana. También existen evidencias que el tratamiento de células con ácido eicosapentaenoico (EPA) modifica la composición de caveolas a través de la translocación de eNOS ([5452]). Del mismo modo, células endoteliales vasculares de la retina humana tratadas con DHA lo incorporan a los fosfolípidos de membrana, desplazando consecuentemente quinasas de la familia Src de las caveolas y las balsas lipídicas ([5947]).

Se especula que, entre muchas otras funciones, las balsas lipídicas reclutan componentes de DISC y apoptosoma facilitando así la conexión entre las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca cuando células de mieloma y leucemia se someten a tratamientos con agentes quimioterápicos ([8453]). En relación a este tipo de tratamientos existen estudios que demuestran que éstos, ya sean *in vitro* o *in vivo*, mejoran su efecto citotóxico cuando se añaden PUFA n-3, concretamente EPA y DHA (6016]). Dichos resultados se basan, entre muchos otros, en la incorporación de los ácidos grasos en las balsas lipídicas, promoviendo así cambios en la distribución o actividad de proteínas relacionadas con estos dominios ([4614],[5501],[6340],[6612],[7429]). La incorporación de ácidos grasos de la dieta afecta la organización de la membrana, sobre todo de la cara interna. Los PUFA n3 aumentan específicamente las agrupaciones de proteínas en los microdominios dependientes de colesterol, mientras que el resto de membrana es insensible a la modulación de dichos lípidos ([6043]). Se ha determinado que los PUFA n3 bloquean la inducción de TNF- $\alpha$  mientras que los PUFA n6 amplifican su señal. Esto es debido al cambio de composición en ácidos grasos asociados a caveolas, que parecen ser importantes para la activación celular endotelial inducida por dicha vía ([6281]).



## F. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos del grupo investigador han demostrado que las dietas ricas en PUFA n-6, como el aceite de maíz, ejercen un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria experimental, mientras que las dietas ricas en aceite de oliva virgen extra, con alto contenido en ácido oleico y compuestos bioactivos, podrían ejercer un efecto potencialmente protector. Estos efectos se realizan fundamentalmente durante la promoción de la carcinogénesis. Los mecanismos a través de los cuales los lípidos de la dieta ejercen sus efectos moduladores no son completamente conocidos. El grupo ha investigado diferentes posibilidades y ha obtenido resultados que apoyan una acción compleja y pleiotrópica, como la alteración de la expresión de genes implicados en proliferación y diferenciación celular, la modulación de vías de señalización intracelular y cambios en el balance proliferación-apoptosis, entre otros. En este sentido, la dieta rica en aceite de oliva se ha asociado a una disminución de la actividad de p21Ras, una *down-regulation* de la vía mediada por Akt y un aumento de la apoptosis, a diferencia de la dieta de aceite de maíz que pareció no actuar a este nivel. La **hipótesis** en la que se basa el presente trabajo es la siguiente:

**Las dietas ricas en aceite de maíz y aceite de aceite de oliva virgen extra ejercen sus efectos moduladores diferenciales de la carcinogénesis mamaria experimental mediante cambios en la composición lipídica y proteica de la membrana de las células tumorales, en concreto de sus dominios. Dichos cambios implican modificaciones en la funcionalidad celular y constituyen la base del diferente comportamiento clínico y morfológico de los adenocarcinomas mamarios que se desarrollan.**

Para poder demostrar esta hipótesis, se han establecido los **objetivos** siguientes:

- 1. Evaluar los efectos moduladores diferenciales de las dietas ricas en aceite de maíz y aceite de oliva virgen extra en la carcinogénesis mamaria experimental a través del estudio de las características histopatológicas y de los parámetros clínicos de la carcinogénesis (tiempo de latencia, incidencia, contenido y volumen tumorales).**
- 2. Estandarizar y validar un método de aislamiento de los diferentes dominios de membrana en tejidos de rata.**

2.1. Estandarizar un método de aislamiento de DRMs en tejido hepático de rata, basándose en las características bioquímicas de cada uno de los dominios de la membrana en cuanto a contenido en proteínas totales y colesterol, y expresión de proteínas específicas marcadoras.

2.2. Validar el método estandarizado en los adenocarcinomas mamarios experimentales.

### **3. Caracterizar el perfil lipídico de la membrana de las células tumorales y sus dominios.**

3.1. Analizar el contenido en tipos de lípidos (esfingolípidos, esteroides, glicerofosfolípidos y lípidos neutros) de la membrana total y de sus dominios.

3.2. Analizar el contenido en ácidos grasos de la membrana total y de sus dominios.

### **4. Analizar los cambios ejercidos por los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica y proteica de la membrana de las células tumorales.**

4.1. Determinar los niveles de proteínas específicas de microdominios de membrana, concretamente de Flot1 y Cav1.

4.2. Analizar el contenido en tipos de lípidos de la membrana total y de sus dominios.

4.3. Analizar el contenido en ácidos grasos de la membrana total y de sus dominios.

4.4. Determinar los niveles de la proteína pro-apoptótica CD95.

4.5. Correlacionar los diferentes parámetros clínicos, bioquímicos y moleculares estudiados.

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 por sus hábitos alimentarios. En consecuencia, este trabajo en su conjunto podría enmarcarse en el campo de la prevención, primaria y secundaria, del cáncer de mama.

---

Introducción

**Material y métodos**

Resultados

Discusión

Conclusiones

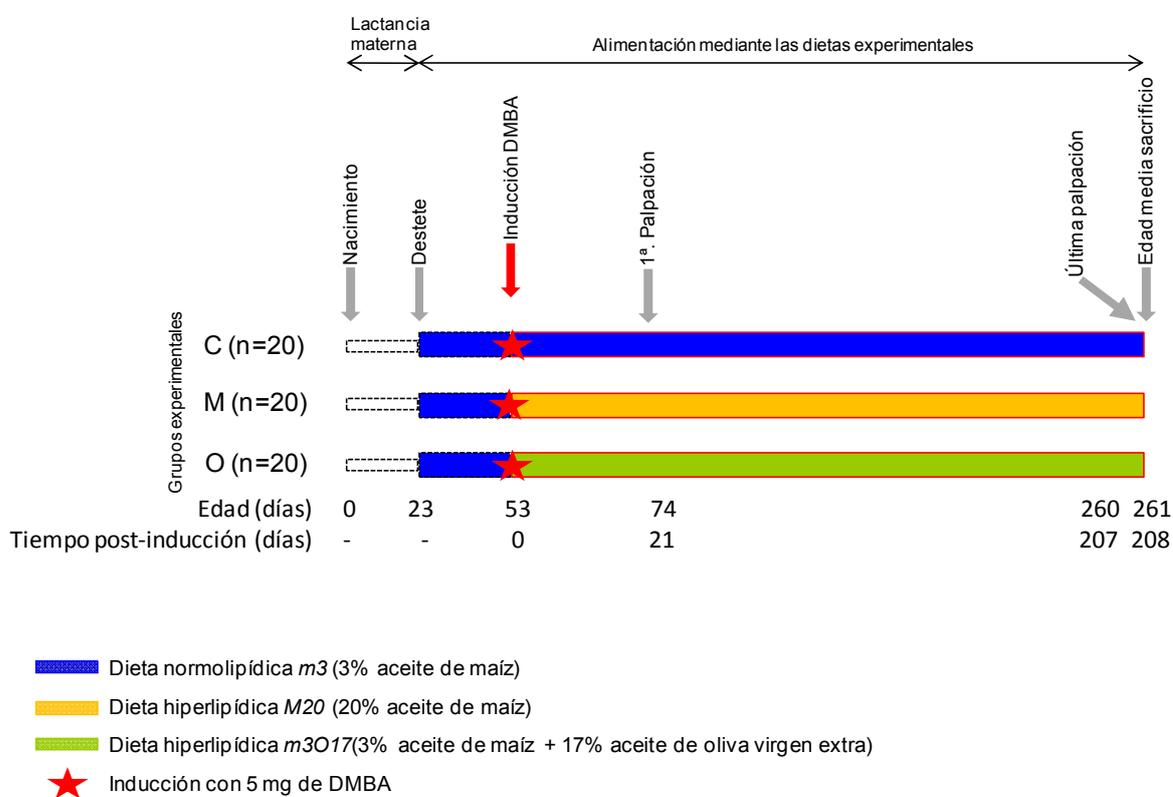
Bibliografía



## A. ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo se soporta experimentalmente en el modelo de cáncer de mama inducido en la rata Sprague-Dawley mediante DMBA. El estudio estuvo integrado por 60 animales distribuidos en 3 grupos según la dieta recibida (Figura 10). En todos los grupos, los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, el día 22-23 de vida. A partir de entonces se les administraron las dietas experimentales: normolipídica (*m3*), en todos los grupos hasta el día de la inducción y en el grupo control (C) hasta el fin del estudio, hiperlipídica rica en aceite de maíz (*M20*), en el grupo M desde el momento de la inducción hasta el sacrificio, o hiperlipídica rica en aceite de oliva virgen extra (*m3O17*), desde la inducción hasta el final del estudio en el grupo O. El diseño experimental se realizó con el objetivo de analizar los efectos diferenciales de las dietas ricas en PUFA n-6 (aceite de maíz) o MUFA n-9 y compuestos minoritarios (aceite de oliva) en la promoción de la carcinogénesis mamaria.



**Figura 10. Diseño experimental**

### Material y métodos

Todos los animales fueron inducidos el día 53 -día 0 del tiempo post-inducción- con una dosis única del carcinógeno DMBA. Para ello, se administraron 5 mg de DMBA disueltos en 1 ml de aceite de maíz mediante instilación buco-gástrica, siguiendo el método de Huggins C et al ([439], [443]) modificado ([1299]). Éste método provoca la aparición de tumores mamarios en la rata de características similares a los humanos ([1438], [4264]). Como el carcinógeno se administró vehiculado en un lípido, a fin de evitar problemas de absorción, a los animales no se les administraron las dietas hiperlipídicas hasta el día después de la inducción (día 54).

A partir del destete los animales fueron pesados e inspeccionados semanalmente para hacer un seguimiento de la evolución ponderal y detectar posibles patologías generales o por desequilibrios nutricionales ([855]). Además, desde el día 74 se palpaban sistemáticamente los animales 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.

El final del ensayo coincidió con el sacrificio de los animales por decapitación a una edad media de 261 días. Previamente al sacrificio se determinó la fase estral de los animales mediante citología vaginal y se seleccionaron los animales en diestro, para conseguir la máxima homogeneidad de las muestras y la mínima interferencia de hormonas endógenas. Únicamente en los dos últimos días se sacrificaron animales que no estaban en dicha fase, a fin de no aumentar en exceso el periodo de sacrificio. Además, no se sacrificó más de un animal 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 ([1232], [1310]). En los animales seleccionados se efectuó la inspección y la palpación y se determinaron las medidas tumorales, el peso corporal y la longitud naso-anal. Con el fin de respetar el ritmo circadiano de algunas hormonas, el sacrificio sólo 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 y 30 minutos después de finalizar su manipulación.

Tras el sacrificio, se efectuó rápidamente la exéresis tumoral y se determinaron los 3 diámetros mayores de cada tumor. Posteriormente se separó una parte representativa de cada tumor o, en el caso de los tumores pequeños, la totalidad del tumor, y se fijó en formol al 10% tamponado con fosfatos para su estudio anatomopatológico. El resto del tumor fue congelado

inmediatamente en nitrógeno líquido. A continuación, se realizaron las necropsias completas de los animales siguiendo los procedimientos descritos en la guía de Rowet ([566]). Las muestras para el estudio anatomopatológico fueron posteriormente incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina.

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

En este trabajo se han utilizado ratas hembras Sprague Dawley (IFFA-CREDO - origen ICO:OFA.SD.[IOPSCaw]-). Al inicio de los experimentos, los animales tenían 23 días y la media de su peso era de 41.8 g. En este momento los animales fueron destetados y alimentados *ad libitum* con agua corriente y la correspondiente dieta experimental.

Los animales se mantuvieron en un estabulario convencional con condiciones de barrera, filtración de aire y presión positiva. Durante todo el estudio, los animales permanecieron a una temperatura de  $+22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un ritmo diario de 12 horas de luz artificial (8:00 h a 20:00 horas) y 12 horas de oscuridad. Se distribuyeron 3 ó 4 animales por caja de  $1000\text{ cm}^2$  de superficie basal.

El cuidado de los animales y el establecimiento cumplían las normas del Real Decreto 223/1988, particularmente las del artículo 8º sobre protección de animales utilizados para la experimentación, las de la Ley 5/1995 de protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, y el Decreto 214/1997 de regulación de la utilización de animales para experimentación y otros fines científicos.

## **3. DIETAS EXPERIMENTALES**

En este trabajo se utilizaron tres dietas semisintéticas con la misma composición cualitativa pero distinto contenido lipídico: dieta normolipídica *m3*, dieta hiperlipídica rica en aceite de maíz *M20* (rica en ácido linoleico (18:2n-6)) y dieta hiperlipídica con alto contenido en aceite de oliva *m3O17* (rica en ácido oleico (18:1n-9)). Todas ellas fueron diseñadas y preparadas en el laboratorio donde se realizó este trabajo y su idoneidad para este ensayo fue anteriormente demostrada ([2567], [2568]), (4303)]. Este aspecto es de gran relevancia dado que la dieta constituye la variable experimental más importante de los estudios sobre la influencia de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental. Para poder asegurar que los resultados obtenidos se deben específicamente a las variaciones de la dieta es imprescindible que ésta sea equilibrada para la rata y que no contenga sustancias que afecten

la carcinogénesis mamaria. La composición cuantitativa de cada dieta se muestra en la tabla 1. Los componentes utilizados y el material necesario se describen a continuación y la composición de los aceites utilizados en las diferentes dietas se muestran en la tabla 2:

### **Componentes**

- Lípidos: Aceite de germen de maíz (Dietisol, Dietisa).  
Aceite de oliva virgen extra (variedad hojiblanca).
- Proteínas: Caseína láctica (Scerma, Coudeville France).
- Carbohidratos: D-Glucosa (J. Escuder S.L.).
- Fibra: Celulosa comestible microcristalina (AVICEL PH 102, Foret S.A.).
- Vitaminas: (J. Escuder S.L.).
  - Liposolubles: DL- $\alpha$ -tocoferol acetato (E), retinol acetato (A), fitil menadiona (K) colecalciferol (D3).
  - Hidrosolubles: Bitartrato de colina, inositol, ácido ascórbico (C), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico, clorhidrato de tiamina (B1), riboflavina (B2), clorhidrato de piridoxina (B6), ácido fólico, biotina, cobalamina (B12).
- Minerales: (J. Escuder S.L.): Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ), carbonato cálcico ( $CaCO_3$ ), fosfato cálcico monohidrato ( $CaHPO_4 \cdot 1H_2O$ ), sulfato magnésico heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), cloruro sódico (NaCl), citrato ferroso amoniacal ( $C_6H_5O_7FeNH_4$ ), sulfato de manganeso monohidratado ( $MnSO_4 \cdot 1H_2O$ ), cloruro de zinc (ZnCl), sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), cloruro de cobalto hexahidratado ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ), yoduro potásico (KI).

### **Material**

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

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

	DIETAS EXPERIMENTALES		
	m3	M20	m3O17
PROTEÍNAS (Caseína)	18,0	23,0	23,0
CARBOHIDRATOS (Glucosa)	67,9	45,9	45,9
LÍPIDOS (Aceite)	3 g aceite de maíz	20 g aceite de maíz	3g aceite de maíz 17 g aceite de oliva
FIBRA (Celulosa)	5,0	5,0	5,0
MEZCLA SALES			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6100000		
CaCO <sub>3</sub>	1,2322576		
CaHPO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	1,0630714		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0000000		
NaCl	0,8350000		
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> FeNH <sub>4</sub>	0,1130148	5,9	5,9
MnsO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	0,0255000		
ZnCl	0,0072964		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0039294		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0002500		
KI	0,0000641		
Total sales:	5,8903837		
MEZCLA VITAMINAS			
A	0,0014000		
D3	0,0000031		
E	0,0227273		
K	0,0001000		
Colina	0,1800000		
Inositol	0,0150000		
C	0,0075000		
Ác. Nicotínico	0,0060000	0,24	0,24
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		

**Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los aceites utilizados en las diferentes dietas experimentales determinada por cromatografía de gases.**

% ÁCIDOS GRASOS			
		Aceite de maíz	Aceite de oliva virgen extra
SFA	Palmítico C14:0	11,2	7,89
	Esteárico C18:0	2,1	2,64
	Araquídico C20:0	0,3	-
MUFA	Palmitoleico C16:1 n-7	0,2	0,49
	Oleico C18:1 n-9	28,2	79,03
	Eicosanoico C20:1 n-9	<0,1	-
PUFA	Linoleico C18:2 n-6	57,1	8,24
	Linolénico C18:3 n-6	0,9	0,6
	<b>Total SFA</b>	13,6	10,53
<b>Total MUFA</b>	28,4	79,52	
<b>Total PUFA</b>	58	8,84	
	<b>Ratio ac.linoleico/oleico</b>	2,02	0,10

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

#### 4. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS

##### Material

- Carcinógeno: DMBA (7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antraceno ó 9,10-dimetil-1,2-benz-antraceno ó 1,4-dimetil-2,3-benzfenantreno) -Sigma-.
- Diluyente: Aceite de maíz (densidad 0.91908 g/ml) -Dietisa-.
- Anestésico: Imalgene 500 (clorhidrato de ketamina -5g de base- y clorbutol -500 mg-) - Rhone Mérieux-.
- Otros: sondas, jeringuillas.

El método empleado para la inducción carcinogénica es el de Huggins C et. al modificado ([439], [443], [1299], [1438]). El DMBA fue disuelto en aceite de maíz a una concentración final de 5 mg/ml. Esta disolución se realizó en un baño a +40°C, en agitación constante, durante 24 horas y protegiendo el carcinógeno de la luz. Los procedimientos que se utilizaron en este trabajo siguieron estrictamente las normas GLP (*Good Laboratory Practices*).

El carcinógeno se administró a los animales a los 53 días de edad. Previamente, las ratas fueron semianestesiadas mediante una inyección intraperitoneal, en la zona abdominal izquierda, de 10 mg de clorhidrato de ketamina/kg (aproximadamente unos 0.05 ml/animal). Posteriormente, se suministró una única dosis de DMBA mediante instilación buco-gástrica realizada con una sonda conectada en su extremo proximal a una jeringuilla de 1 ml. La dosis única de carcinógeno fue de 5 mg de DMBA/animal, 1 ml de la solución de aceite.

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

### **Material**

- Balanza "Sartorius Mc1" (Laboratory LC6200).
- Microscopio "Laborlux 11"(Leitz).
- Centrífuga "EconoSpin Sorvall<sup>®</sup>" (DuPont Instruments).
- Guillotina, tijeras, bolsas de plástico cónicas con extremo distal abierto.
- Éter etílico, caja de anestesia.
- Herramientas de disección.
- Tubos de heparina-litio, tubos siliconizados.
- Formol al 10% tamponado con fosfatos.
- Otros: algodón, embudos, gradillas, espátulas de algodón, suero fisiológico, protaobjetos, cubreobjetos, recipientes de cristal, pipetas Pasteur, etc.

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

Las exploraciones se iniciaron inmediatamente después del destete de los animales. Sin embargo, las palpaciones no comenzaron hasta el día 74. Éstas 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 nódulos, a través de la piel, con el pulgar y el índice y, posteriormente, presionar a lo largo del

### Material y métodos

cuerpo con el dedo plano a fin de descubrir las pequeñas irregularidades. Los nódulos encontrados en cada exploración se emplazaron en un esquema corporal para cada una de las ratas. Asimismo, se midieron los dos diámetros mayores de cada nódulo con un nonius.



**Figura 11. Exploraciones periódicas de los animales.**

Al final del ensayo, todos los animales fueron sacrificados. A fin de obtener muestras en condiciones homogéneas, se sacrificaron todos los animales en la misma fase del ciclo estral. La selección del diestro se realizó basándose en las características de dicha fase: mayor duración ([855], [1610]), facilidad para su identificación diagnóstica, estado hormonal ([840], [1023]) y los efectos conocidos de las dietas hiperlipídicas sobre su duración y estado hormonal ([918], [945], [1046]). La determinación de la fase estral se realizó mediante citología vaginal. Se recogieron las células mediante una espatulilla provista, en su extremo distal, de algodón empapado en suero fisiológico. Las células se extendieron sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos, y se procedió a su observación microscópica. La presencia de abundantes leucocitos, escasas células epiteliales de la capa basal y moco en cantidad variable, caracterizó inequívocamente, la fase estral de diestro en las ratas ([1232], [1610]).

Los animales fueron sacrificados por decapitación troncular. En la proximidad de la zona del sacrificio se dispuso también de un sistema de anestesia con éter etílico para cubrir posibles eventualidades, que no fue necesario utilizar. El método de decapitación troncular con guillotina fue escogido por considerarse uno de los métodos más humanitarios para sacrificar a los animales y el más eficaz. ([1232]). Además, está exento de los problemas que tiene la anestesia con éter, tanto para el tipo de estudio (principalmente los relacionados con la posible influencia sobre parámetros hormonales ([922], [935], [1232]), como para los animales (estrés por asfixia e irritación de membranas y mucosas). El animal seleccionado era introducido en el interior de una bolsa cónica cuyo extremo distal estaba abierto para que

podiese respirar. Así se inmovilizaba el animal, actuando con mayor rapidez y reduciendo el grado de estrés. Tras el sacrificio, se procedía a la limpieza exhaustiva de todo el material y a la ventilación de la sala antes de continuar con el siguiente animal ([1232]). El horario de sacrificio, la edad de los animales y la selección y el número de animales sacrificados por caja y día ya fueron indicados en el apartado A.1. de este capítulo, así como la necropsia, la recogida y el procesamiento de las muestras.

El estudio histopatológico se realizó en colaboración con una patóloga. Las muestras se fijaron en formol al 10% tamponado con fosfatos, y se incluyeron en parafina. Se practicaron varios cortes de cada muestra (de 1 a 3) de 5 µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina. El diagnóstico de las biopsias tumorales se basó esencialmente en los criterios de Young y Hallowes ([1141]). Además del diagnóstico histopatológico de las lesiones, se analizó el grado arquitectural y nuclear de los adenocarcinomas, el número de mitosis en 10 campos de gran aumento (400X) para valorar el grado histológico basado en el método de *Scarff-Bloom-Richardson* (SBR), utilizado en carcinomas de mama humanos, adaptado a la rata por parte del equipo investigador ([4264]) así como la reacción estromal.

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

### **Material**

- Autoclave *SterilClav-75 Dry* (Raypa).
- Bomba de vacío (Telstar)
- Cámaras de cromatografía (Merk).
- Centrífuga 5415R (Eppendorf).
- Centrífuga refrigerada *Sorvall® RC-6* (DuPont Instruments), rotor SH 3000 BK.
- Ultracentrífuga *Sorvall™ WX*, rotor vasculante SW41 Ti.
- Equipo de calibración de pH “GLP 21” (Crison).
- Equipo de homogenización de tejidos *Polytron* (Kinematica).
- Fuentes de alimentación electroforética “Power Supply 200/2 (BioRad), “Power Supply 3500” (Pharmacia Biotech), Power Basic (BioRad).
- Lector de placas *NanoQuant infinite M200* y programa *Tecan i-control 1.6* (Tecan).
- Microcentrífuga *Microfuga™ 11* (Beckman).
- Programa de análisis de imagen: *Quantity One™* (BioRad).

### Material y métodos

- Sistema de captura de imágenes en tiempo real *Gel Doc 2000* (BioRad).
  - Unidades de electroforesis *Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell* (BioRad) y *PROTEAN<sup>®</sup> II xi Cell* (BioRad).
  - Unidad de transferencia electroforética *Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell* y *Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad).
  - *ChemiDoc<sup>™</sup> XRS+* acoplado al programa informático *Image Lab<sup>™</sup> 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.

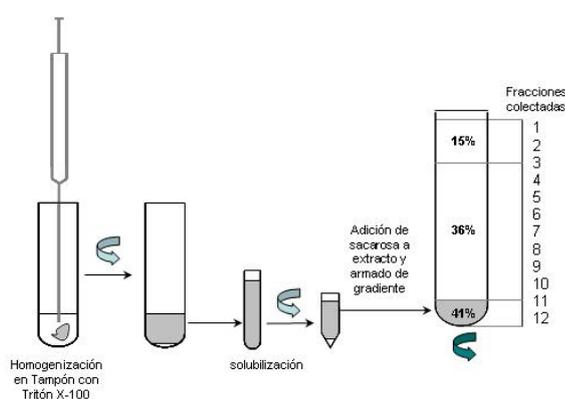
El material fungible utilizado y las soluciones específicas de las diferentes técnicas bioquímicas y de biología molecular se detallan en los correspondientes apartados.

## **1. AISLAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA**

Las diferentes fracciones de membrana que formaron parte del estudio, se obtuvieron a partir de muestras de tejido tumoral mamario congelado a -80°C, aunque previamente se estandarizó con muestras de hígado del grupo control con el objetivo de disponer de una situación de referencia, en un tejido no diana del carcinógeno. Por otra parte, el tamaño de dicho órgano permite estandarizar todas las técnicas necesarias para el estudio sin comprometer las muestras tumorales que son mucho más pequeñas y valiosas. Una vez comparados diferentes protocolos, el aislamiento de fracciones de membrana se realizó siguiendo el protocolo de Mukherjee A. et al 2003 modificado ([6439]). Se pesaron 200 mg de tejido directamente en un tubo conteniendo 2 mL de *Buffer Raft II* (*Buffer Raft I* – 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 20mM NaF, 5mM β-Mercaptoetanol, inhibidores de proteasas (Sigma)-, 1% Triton X-100, 5% Glicerol) preparado durante el día de su utilización y previamente enfriado a +4°C. La relación peso muestra/volumen *buffer* fue 1/10. Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido o nieve carbónica antes de introducirlas en el tubo 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 con un *Polytron* a potencia 26000 rpm con un vástago de 7 mm realizando 3 pulsos de 15 segundos cada uno y manteniendo los tubos a +4°C. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 5

## Material y métodos

minutos a 500  $\times g$  a  $+4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga refrigerada *Sorvall*<sup>®</sup> RC-6 (Du-Pont Instruments) y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente éste fue incubado durante 1 hora a  $+4^{\circ}\text{C}$  en agitación y centrifugado a 500  $\times g$  durante 5 minutos a  $+4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue recuperado y 1.5 mL del mismo fueron trasvasados a un tubo de 5 mL previamente enfriado y se les adicionó sacarosa hasta obtener una concentración final del 41%. El volumen restante del sobrenadante se consideró como “Extracto total de membrana” y se cuantificó su concentración de proteínas. Seguidamente, se procedió al montaje del gradiente de sacarosa en un tubo de ultracentrífuga previamente enfriado en el cual se colocaron 1.5 mL de la solución de sacarosa 41%, 8 mL de sacarosa 36% y 2.5 mL de sacarosa 15%, estas dos últimas soluciones preparadas en *Buffer Raft I* frío, des del fondo hasta la parte superior del mismo. A continuación, se ultracentrifugó a 222000  $\times g$  durante 18 horas a  $+4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se recogieron 12 fracciones de 1 mL cada una desde la parte superior del tubo hasta el fondo. Se procedió a la determinación de la concentración de proteínas de dichas fracciones. El proceso de obtención de fracciones de membrana se esquematiza en la figura 12.



**Figura 12. Proceso de aislamiento de fracciones de membrana.**

## **2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

La cuantificación de proteínas de los extractos totales de membrana y las diferentes fracciones obtenidas se realizó mediante el método de *Lowry*, utilizando el Kit *DC Protein Assay II* (BioRad), versión microplaca. El procedimiento seguido con este kit requirió la dilución apropiada previamente al ensayo de las muestras en agua y la utilización de una curva estándar *Bovine Serum Albumin (BSA) Standar Set* (BioRad). A 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra se le añadieron 25  $\mu\text{L}$  de DC Reactivo A' y 200  $\mu\text{L}$  de DC Reactivo B y se incubaron 15

minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia a 750 nm. A partir de los valores de la absorbancia de la recta patrón se pudo calcular la concentración de proteínas de las diferentes muestras problema.

### **3. ANÁLISIS DE PROTEINAS POR WESTERN BLOT**

Se llevaron a cabo 2 tipos de ensayos WB, unos con el fin de caracterizar las diferentes fracciones de membrana (los llamados WB de marcadores/caracterización) y otros para analizar el efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición proteica tanto de los microdominios de membrana como de los extractos totales (WB de expresión).

Las proteínas fueron preparadas a las concentraciones adecuadas para cada ensayo (Tabla 3). Se les adicionó Laemli Buffer (BioRad) con  $\beta$ -mercapto-etanol al 5% en proporción 1:1 y posteriormente fueron desnaturalizadas por tratamiento a +90-+100°C durante 4 minutos. Seguidamente, fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida entre el 8 y el 12% con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), 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 TBS-T (20mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05-0.5% Tween-20) con 5% BSA y/o leche descremada en polvo durante una hora/toda la noche a temperatura ambiente/+4°C, según la especificidad del anticuerpo. La membrana se incubó con el anticuerpo adecuado a la concentración indicada en la tabla 3 durante 2/16 horas a +4°C en agitación. Tras realizar tres lavados en TBS-T 0.1% durante 10 minutos cada uno en agitación, se incubó la membrana con la solución apropiada de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Tabla 3), preparada en leche en polvo descremada al 5% en TBS-T 0.1%, durante 1 hora 30 minutos/2 horas 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*” y “*Luminata Crescendo Western HRP Substrate*” (Millipore), y reveladas en film de autoradiografía (*Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience*). El contenido proteico se determinó por densitometría mediante el sistema de análisis de imágenes Gel Doc 2000 y el programa Quantity One (BioRad Laboratories). Los valores fueron normalizados al valor medio del triplicado de un control interno y relativizados a  $\mu$ g de proteína.

**Tabla 3: Anticuerpos utilizados y condiciones de los ensayos *Western Blot***

	ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	MUESTRA ( $\mu\text{L}$ )	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO
WB marcadores	Anti-caveolin 1	Millipore	05-762	10	1:500	anti-ratón
	Anti-flotillin 1	BD Transduction Laboratories	610821	10	1:1000	anti-ratón
	rTf	Zymed Laboratories	13-6800	50	1:750	anti-ratón
<b>MUESTRA (<math>\mu\text{g}</math>)</b>						
WB expresión	Anti-caveolin 1	Millipore	05-762	2	1:2000	anti-ratón
	Anti-flotillin 1	BD Transduction Laboratories	610821	1	1:5000	anti-ratón
	Anti-Fas (FL-335)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7886	20	1:500	anti-conejo

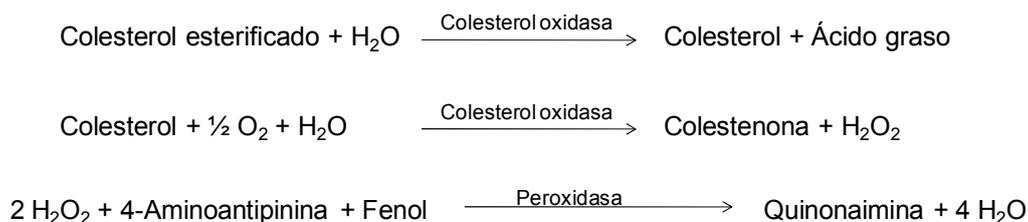
#### 4. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

A partir de los extractos totales de membrana así como de las diferentes fracciones obtenidas durante el fraccionamiento de ésta, congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se procedió a la extracción lipídica siguiendo el método de Blight-Dyer ([8403]) modificado.

Setenta y cinco  $\mu\text{g}$  de proteína se diluyeron en agua destilada hasta 500  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se mezclaron con 7.5 mL de cloroformo:metanol (Scharlau) (1:2) enfriados previamente y se agitó vigorosamente la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 2.5 mL de cloroformo frío (Scharlau) y 4 mL de agua destilada mantenida en hielo, se volvió a agitar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1300  $\times\text{g}$  durante 15 minutos a  $+4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga *Sorvall*<sup>®</sup> RC-6. Transcurrido este tiempo, se recogió la fase orgánica y se guardó en un tubo de vidrio tapado. A la fase no orgánica se le añadieron 4 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (1:1) y 2 mL de agua destilada, ambas enfriadas previamente, se agitó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1300  $\times\text{g}$  durante 10 minutos a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, la fase no orgánica fue eliminada con una bomba de vacío y la fase orgánica se recogió y se mezcló con la obtenida anteriormente. El último paso de la extracción consistió en eliminar el exceso de proteínas que pudieran contener las fases orgánicas. Para ello se añadió una tercera parte de  $\text{CaCl}_2$  1.5 M en relación al cloroformo utilizado hasta el momento, se mezcló enérgicamente durante 15 segundos, se centrifugó a 1300  $\times\text{g}$  durante 10 minutos a  $+4^{\circ}\text{C}$  y se eliminó la fase no orgánica, de igual manera que se hizo anteriormente. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó con ayuda de un baño para acelerar el proceso y bajo un flujo constante de nitrógeno gas para evitar al máximo la oxidación de los lípidos. Una vez evaporadas las muestras, los lípidos se resuspendieron en tolueno frío (Scharlau) y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera inerte.

## 5. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN FRACCIONES DE MEMBRANA DE HÍGADO

La cuantificación de colesterol en fracciones de membrana de tejido hepático se realizó a partir de un método basado en la determinación espectrofotométrica de quinonimine, el cual es un producto de reacciones consecutivas de las enzimas colesterol oxidasa y peroxidasa tal y como se muestra en el siguiente esquema:



Se mezclaron cada una de las diferentes fracciones de membrana con una mezcla de reactivos para cuantificar específicamente el colesterol total (*Byosystems*) (35 mM Pipes pH7, 0.5 mM *sodium cholate*, 28mM fenol, 0.2 U/mL colesterol esterasa, 0.1 U/mL colesterol oxidasa, 0.8 U/mL peroxidasa y 0.2 mM 4-aminoantipirina). Seguidamente, se agitó bien la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorvancias, tanto de las muestras como de los puntos de la recta estándar utilizada.

## 6. ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para la cromatografía en capa fina (TLC) se utilizó el procedimiento descrito por Ruiz y Ochoa ([7057]) con algunas modificaciones. Previamente al ensayo se construyó una mezcla de extractos lipídicos comerciales y posteriormente un banco de diluciones de dicha mezcla para la obtención de una recta estándar para cuantificar cada uno de los lípidos. Seguidamente se procedió a la cromatografía para separar los lípidos tanto de la recta estándar como de las muestras en estudio.

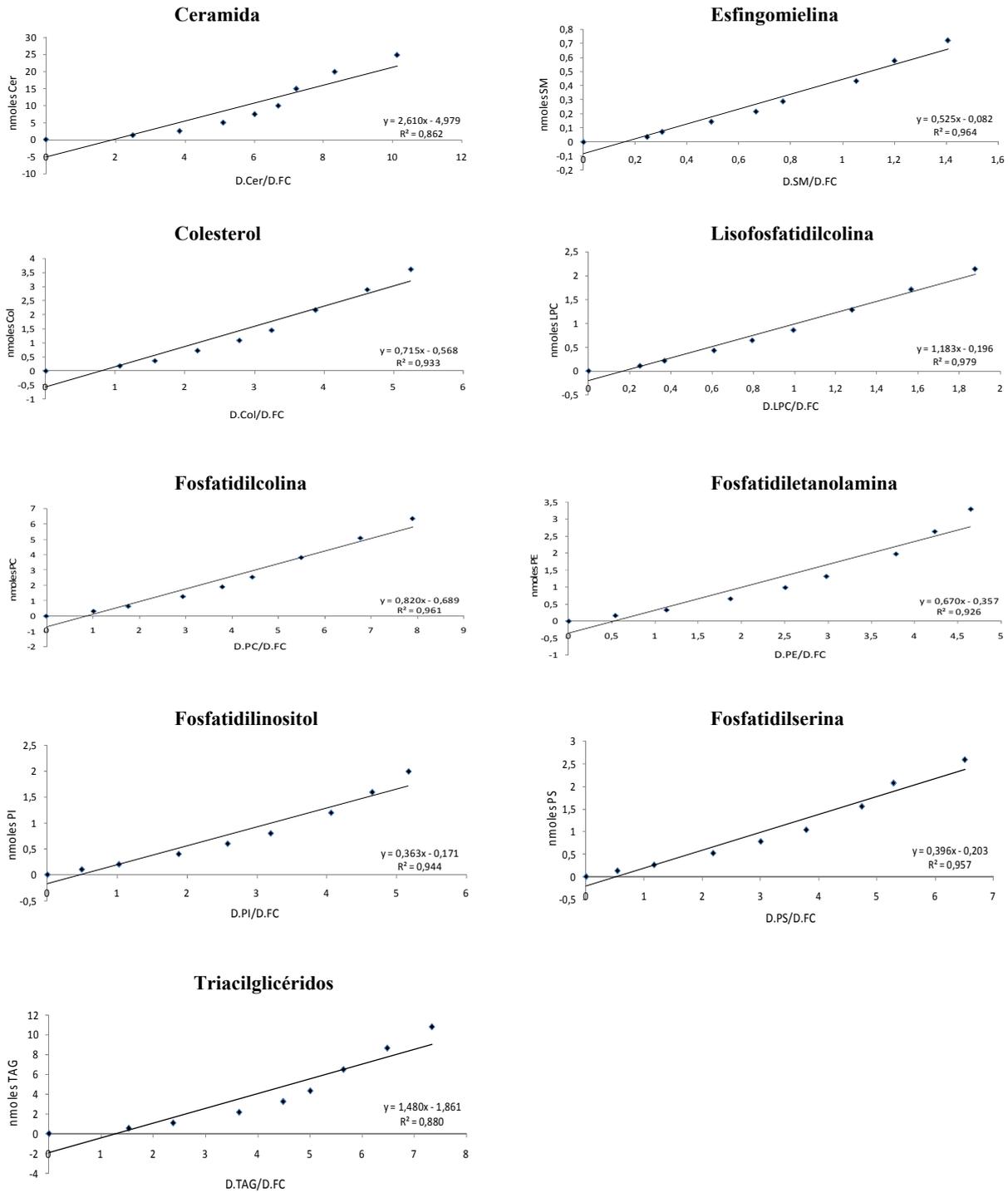
### Preparación de la recta estándar

Se preparó una recta estándar con los siguientes lípidos: lisofosfatidilcolina (LPC), esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE), colesterol (Col), triacilglicéridos (TAG) y ceramida (Cer). Dentro de cada punto de la recta se añadió formiato de colesterol (FC) como lípido normalizador para relativizar los resultados.

### Material y métodos

Los extractos lipídicos comerciales, la mayoría en polvo (Tabla 4), fueron resuspendidos en un volumen determinado de cloroformo (Scharlau) o tolueno (Scharlau) en función de la concentración del *stock* de lípido necesaria para hacer la mezcla posterior. Una vez disueltos los lípidos comerciales, se hicieron alícuotas del volumen necesario de cada uno y se preparó una mezcla ("Mix"), con todos los lípidos excepto con el FC. A continuación, se evaporaron los solventes con nitrógeno gas y la ayuda de un baño a 37°C. Posteriormente, se resuspendió toda la mezcla en 2 mL de tolueno, se mezcló y se enfrió en hielo para evitar al máximo la evaporación del solvente. A continuación, se procedió a la preparación de los 8 puntos de la recta estándar (Tabla 4). Para ello, se alicuotaron 25 µL para el punto 1, 50 µL para el punto 2, 100 µL para el punto 3, 150 µL para el punto 4, 200 µL para el punto 5, 300 µL para el punto 6, 400 µL para el punto 7 y 500 µL para el punto 8. A cada uno de ellos se les añadió 20 µL de la solución stock de FC (tabla 4). Finalmente, todos los volúmenes fueron evaporados y se volvieron a resuspender en un volumen final de 520 µL de tolueno frío para conseguir la concentración deseada de cada lípido. A la hora de cuantificar, de cada punto de la recta estándar se obtuvo un valor densitométrico que fue relativizado con el valor densitométrico del FC para ese mismo punto (Figura 13).

*Material y métodos*



**Figura 13.** Imagen representativa de las rectas de regresión obtenidas para cuantificar los lípidos de membrana. Cada gráfica se obtuvo del promedio de rectas de regresión realizadas a lo largo de los ensayos de cromatografía en capa fina. El eje de las ordenadas representa el valor "teórico" de lípido estándar que hay en cada punto de la recta estándar expresado en nanomoles de lípido y el eje de las abscisas se obtiene de relativizar el valor de la densitometría óptica obtenida en cada punto de la recta del lípido estándar con el del lípido normalizador (FC).

Tabla 4: Recta estándar utilizada para cuantificar los lípidos separados por cromatografía en capa fina.

LÍPIDO	ESTADO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	PM	DISOLVENTE	CANTIDAD (mg)	VOLUMEN DISOLVENTE (mL)	STOCK (mg/ml)	STOCK (mM)	VOLUMEN	CANTIDAD DE LÍPIDO EN LA MIX EN LA MIX (nm)	CONCENTRACIÓN DE LÍPIDO EN LA MIX (nmol/ $\mu$ L)
LPC	Polvo	Avanti Polar	845875P	521,67	Cloroformo	25	11,1	2,25	4,31	345	1488,018	0,744
SM	Polvo	Avanti Polar	860062P	731,09	Cloroformo	25	12,5	2	2,73	183,3	501,449	0,251
PC	Polvo	Avanti Polar	840055P	786,12	Cloroformo	25	2,5	10	12,72	345	4388,682	2,194
PS	Polvo	Avanti Polar	840032P	812,05	Cloroformo	10	0,8	12,5	15,39	117,2	1804,096	0,902
PI	Polvo	Avanti Polar	840042P	909,12	Cloroformo	10	1	10	10,99	125	1374,971	0,687
PE	Polvo	Avanti Polar	840026P	768,06	Cloroformo	25	2,5	10	13,02	175	2278,483	1,139
Col	Polvo	Sigma	C8667	386,7	Tolueno	10	1	10	25,859	97	2508,404	1,254
TAG	Acete	Sigma	T7140	885,5	Tolueno	55,67	4,95	10	11,29	665	7510,221	3,755
Cer	Polvo	Matreya	1323-05	582	Tolueno	10	2	5	8,6	2000	17200	8,6
*FC	Polvo	Sigma	S448532	414,678	Tolueno	17,3	10	1,73	4,17 nmol/ $\mu$ L	no se añade	no se añade	no se añade

Concentración de lípidos (nmol/ $\mu$ L) en cada punto de la recta estándar												
Puntos	LPC	SM	PC	PS	PI	PE	Col	TAG	Cer	FC		
1	0,035	0,012	0,105	0,043	0,033	0,054	0,06	0,18	0,413	0,166		
2	0,071	0,024	0,21	0,086	0,066	0,109	0,12	0,361	0,826	0,166		
3	0,142	0,048	0,421	0,173	0,132	0,219	0,241	0,722	1,65	0,166		
4	0,214	0,072	0,632	0,26	0,198	0,328	0,361	1,083	2,48	0,166		
5	0,285	0,096	0,843	0,346	0,264	0,438	0,4823	1,443	3,3	0,166		
6	0,428	0,144	1,265	0,52	0,396	0,657	0,723	2,166	4,96	0,166		
7	0,571	0,192	1,687	0,693	0,528	0,876	0,9643	2,888	6,61	0,166		
8	0,714	0,24	2,109	0,967	0,66	1,095	1,205	3,61	8,26	0,166		

Cantidad de lípidos (nmoles) en 3 $\mu$ L (volumen aplicado en la placa de TLC)												
Puntos	LPC	SM	PC	PS	PI	PE	Col	TAG	Cer	FC		
1	0,107	0,036	0,316	0,13	0,099	0,164	0,181	0,541	1,24	0,5		
2	0,215	0,072	0,633	0,26	0,198	0,329	0,362	1,083	2,48	0,5		
3	0,429	0,145	1,266	0,52	0,397	0,657	0,724	2,166	4,96	0,5		
4	0,644	0,217	1,899	0,781	0,595	0,986	1,085	3,25	7,44	0,5		
5	0,858	0,289	2,532	1,041	0,793	1,315	1,447	4,333	9,9	0,5		
6	1,288	0,434	3,798	1,561	1,19	1,972	2,171	6,499	14,88	0,5		
7	1,717	0,579	5,064	2,082	1,587	2,629	2,894	8,666	19,85	0,5		
8	2,146	0,723	6,33	2,602	1,983	3,286	3,618	10,832	24,8	0,5		

LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidilinositol; TAG: triacilglicéridos; Cer: ceramida; FC: formiato de colesterol.

## **Cromatografía en capa fina y cuantificación de los lípidos de membrana**

El primer paso consistió en impregnar las placas de cromatografía recubiertas de sílica (Macherey-Nagel) con una solución EDTA 1mM pH 5.5 a temperatura ambiente dentro de una cámara de cromatografía, con el fin de mejorar la separación de las fracciones lipídicas. Seguidamente, se dejaron secar las placas reservadas del polvo. Una vez secas, las placas se dejaron toda la noche en una solución cloroformo:metanol:agua (60:40:10), preparada previamente y mantenida en reposo para que la cámara se saturara bien con los vapores de los solventes. Posteriormente, se procedió al secado de las placas y se activaron durante 30 minutos a +100°C. Una vez atemperadas (a temperatura ambiente) se procedió a la aplicación manual de los 8 puntos de la recta estándar y de las muestras problema. La aplicación se realizó gota a gota con una pipeta automática de 10 µL y con la ayuda de aire para secarlas. Se aplicaron 3 µL de cada uno de los puntos de la recta estándar y en el caso de las muestras el volumen correspondiente a 20-50 µg de proteína. Seguidamente, las placas fueron incubadas en las diferentes cámaras de cromatografía, que contenían las diferentes soluciones de solventes, para saturar bien las cámaras con sus vapores, haciendo llegar cada solvente hasta la distancia necesaria para obtener una buena separación de las fracciones lipídicas (Tabla 5).

**Tabla 5. Solventes utilizados en la cromatografía en capa fina**

<b>CÁMARA</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>VOLUMEN</b>	<b>DISTANCIA (cm)</b>	<b>FUNCIÓN*</b>
1	cloroformo:metanol:agua	60:40:10	2,3	Concentrar
2	cloroformo:metanol:agua	65:40:05	2,8	LPC, SM
3	etilacetato:etanol:isopropanol:metanol:cloroformo:KCl 0,25%	35:20:5:15:22:9	6	PS, PC, PI, PE, CER
4	tolueno:dietiléter:etanol	60:40:03	9	COL
5	N-heptano:dietiléter	94:08:00	12,5	TAG, FC
6	N-heptano	100	13,5	Lavar impurezas

\* Lípidos separados con cada solvente; LPC: lisofosfatidilcolina; SM: esfingomielina; PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina; CER: ceramida; COL: colesterol; TAG: triacilglicéridos; FC:formiato de colesterol.

Entra cámara y cámara se procedió al secado de las placas con aire. Una vez se pasaron por todas las cámaras de cromatografía, se dejaron secar al aire. Seguidamente, se introdujeron en la cámara de revelado que contenía una solución de sulfato cúprico 10% en ácido ortofosfórico al 8%, se secaron y se pasaron rápidamente a una estufa donde se incubaron a +200°C durante 3 minutos. Para finalizar el proceso se escanearon las placas y se determinó el contenido de lípidos por densitometría a través del programa *Quantity One* (Bio-

Rad Laboratories). Los valores densitométricos fueron normalizados al valor medio de los 8 puntos del lípido FC incluido dentro de la recta estándar.

## **7. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

El primer paso consistió en extravasar la muestra a un tubo de vidrio y añadir 2 mL de Solución B de transesterificación (93.5 % metanol y 6.5% cloruro de acetilo -Fluka-) y mezclar enérgicamente durante un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó durante 90 minutos a +75°C y se dejó enfriar para, seguidamente, añadir 1 mL d'una solución de cloruro de sodio (NaCl) saturada y 0.75 ml de n-hexano (Scharlau). Se agitó la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a +4°C durante 10 minutos a 4400 rpm (4000 xg). Finalmente, se extrajo la fase orgánica, correspondiente al sobrenadante, y se traspasó a un vial de inyección para cromatografía de gases. Se inyectó 1 µL de extracto lipídico en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con columna DB-23, las dimensiones de la cual eran 30 m x 0.25 x 0.25 a un flujo de 2 mL/min. Las condiciones de temperatura de la cromatografía se muestran en la tabla 6:

**Tabla 6. Condiciones de temperatura cromatográfica**

	Relación °C/min	Valor °C	Tiempo de carga (min)	Tiempo de ejecución (min)
Inicio		150	1	1
Rampa 1	25	180	0	2,2
Rampa 2	5	220	1	11,2

Se dejó un tiempo de equilibrado de 3 minutos manteniendo el horno a una temperatura máxima de 250°C. Finalmente se usó un detector de calor a una temperatura de 260° con un flujo de nitrógeno y de aire de 35 mL/min y 350 mL/min respectivamente.

Los ácidos grasos analizados en el estudio se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Ácidos grasos analizados en el estudio**

ÁCIDOS GRASOS		
SFA	C12:0	Laúrico
	C14:0	Mirístico
	C16:0	Palmítico
	C17:0	Margárico
	C18:0	Esteárico
	C20:0	Araquídico
	C21:0	Heneicosanoico
	C22:0	Behénico
	C23:0	Tricosanoico
	C24:0	Lignocérico
MUFA	C16:1n7	Palmitoleico
	C17:1n7	Margaroleico
	C18:1n9-t	Elaídico (Trans-oleico)
	C18:1n9	Oleico
	C18:1n7	Vaccénico
	C20:1n9	Eicosenoico
	C22:1n9	Erúcido
PUFA	C18:2n6-t	Trans-CLA
	C18:2n6	Linoleico
	C18:3n6	Linolénico
	C18:3n3	$\alpha$ -Linolénico
	C20:2n6	Eicosadienoico
	C20:3n6	Eicosatrienoico
	C20:4n6	Araquidónico
	C20:5n3	Eicosapentaenoico
	C22:2n6	Docosadienoico

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

## C. ANÁLISIS DE LOS DATOS

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

## 1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

### 1.1 Carcinogénesis

Los datos obtenidos en 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-. El estudio de la regresión tumoral parcial se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

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

#### **Datos cuantitativos**

**Estudio temporal:** Comparación entre curvas mediante 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 Kruskall-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. 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.

### **Datos cualitativos**

Prueba de la ji-cuadrado ( $\chi^2$ ).

### **Correlaciones**

El grado de correlación de los diferentes parámetros fue calculado a partir de correlaciones bivariadas calculando el coeficiente de *Pearson*, para datos paramétricos, y los coeficientes *rho de Spearman* y *tau-b de Kendall* para datos no paramétricos, con sus niveles de significación.

---

Introducción

Material y métodos

**Resultados**

Discusión

Conclusiones

Bibliografía



## **A. EVOLUCIÓN PONDERAL, PATOLOGÍA MAMARIA Y PARÁMETROS DE LA CARCINOGENESIS**

### **1. EVOLUCIÓN PONDERAL**

El estudio del crecimiento de los animales de los tres grupos experimentales se basó en el análisis ponderal, a partir de la evolución de los pesos a lo largo del tiempo. Los datos se obtuvieron en las 33 determinaciones semanales del peso corporal.

Dicho análisis se realizó mediante un test de hipótesis basado en intervalos de confianza. Se utilizó la metodología de los Modelos Mixtos ([3935]), que tiene en cuenta los efectos fijos (comportamiento común de cada grupo) y los efectos aleatorios (efecto de cada individuo). Empleando dicha metodología para ajustar un modelo lineal para cada grupo, basado en la evolución del peso de los individuos, se pudo contrastar mediante intervalos de confianza la significación de las diferencias entre grupos. Así, se diseñó un modelo polinómico de segundo orden (parábola) y se calculó el modelo mixto basado en la función:

$$P_i = (\beta_0 + b_{i0}) + (\beta_1 + b_{i1}) \times \log(t_i) + (\beta_2 + b_{i2}) \times \log^2(t_i)$$

donde el peso ("P") de los individuos ("i") está en función del tiempo ("t"), y donde " $\beta$ " representa los efectos fijos y " $b_i$ " el efecto individuo. Esta función se puede expresar como una nueva variable mediante la siguiente transformación:

$$X_{1i} = - [\beta_0/\beta_2 + \beta_1/\beta_2 \times \log(t_i) + \log^2(t_i)]$$

que es el modelo lineal con el que poder comparar las diferentes pendientes de cada grupo. A partir de las pendientes calculadas para cada grupo, se obtuvieron los respectivos intervalos de confianza y los datos se expresaron como porcentaje del conjunto poblacional.

La comparación de los intervalos de cada grupo no mostró diferencias estadísticamente significativas, debido a que los tres grupos presentaron intervalos solapados entre ellos (Tabla 8).

Tabla 8. Estudio de la evolución ponderal.

GRUPO	INTERVALO DE CONFIANZA (%)		
	Inferior	Pendiente	Superior
C	95,3	98,9	102,6
M	98,1	101,7	105,4
O	95,1	98,8	102,4

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva.

Por otra parte, los pesos fueron homogéneos a lo largo del estudio (Figura 14A), y los coeficientes de variación fueron uniformemente bajos y de evolución constante en todos los grupos experimentales (Figura 14B).

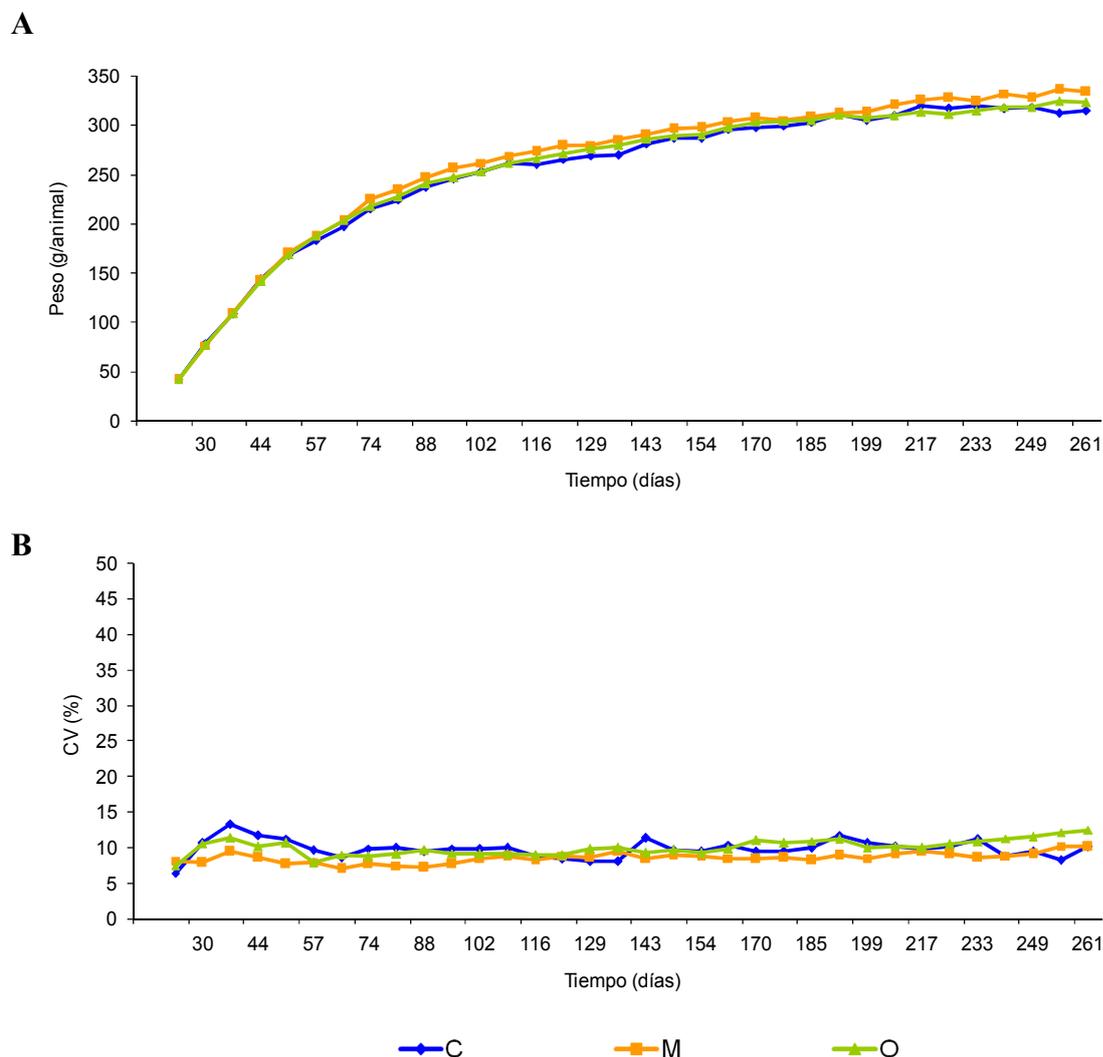


Figura 14. Evolución (A) y coeficiente de variación (B) ponderales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; CV(%): coeficiente de variación (%).

## 2. HISTOPATOLOGÍA MAMARIA

El diagnóstico histopatológico de las afecciones que presentaron los animales se basó en los exámenes anatomopatológicos de las biopsias de nódulos y órganos u otras estructuras que en el momento de la necropsia aparecieron como anormales por su aspecto y/o tamaño. Cabe destacar que a lo largo de los ensayos se dedicó especial atención a la exploración de las posibles patologías causadas por desequilibrios nutricionales. Dicho diagnóstico fue efectuado por un especialista en anatomía patológica.

Las afecciones mamarias se clasificaron en función de los diferentes tipos histológicos como patología maligna y benigna, destacando que dentro de ésta última se consideraron diferentes tipos de lesiones neoplásicas entre otras, ya que algunas de ellas pueden evolucionar desfavorablemente (Tabla 9).

**Tabla 9. Patología mamaria.**

	C	M	O
<b>PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MALIGNA</b>			
Adenocarcinoma	72	95	69
<b>PATOLOGÍA BENIGNA</b>			
<b>Neoplásica:</b>			
Adenoma	6	10	8
Fibroadenoma	13	14	12
Fibroma	1	2	1
Papiloma	2	-	-
Lipoma	-	-	1
<b>Otras:</b>			
<b>Quística:</b>			
Éctasis ductal	-	-	2
<b>No Quística:</b>			
Hiperplasia lobulillar	5	15	16
Fibrosis	-	-	-

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva.

Asimismo, se analizaron diversos parámetros histopatológicos en los adenocarcinomas de los distintos grupos experimentales. Concretamente, se analizaron 69 adenocarcinomas del grupo C, 91 del grupo M y 67 del grupo O. Se analizaron: a) el grado arquitectural, b) el grado nuclear, como expresión de su diferenciación morfológica, c) el número de mitosis en

10 campos de gran aumento, como muestra de su capacidad proliferativa y, finalmente, d) la reacción estromal (desmoplasia), como indicativo de la capacidad invasiva (tabla 10).

**Tabla 10. Características histopatológicas de los adenocarcinomas de los diferentes grupos experimentales.**

		Numero de adenocarcinomas (%)		
		C	M	O
Diferenciación morfológica	<u>Grado arquitectural</u>			
	I	42 (60,9%)	42 (46,1%)	37 (55,2%)
	II	15 (21,7%)	36 (39,6%)	17 (25,4%)
	III	12 (17,4)	13 (14,3%)	13 (19,4%)
	<u>Grado nuclear</u>			
	I	37 (53,6%)	38 (41,8%)	37 (55,2%)
II	20 (29%)	31 (34,1%)	13 (19,4%)	
III	12 (17,4%)	22 (24,2%)	17 (25,4%)	
Capacidad proliferativa	<u>Numero de mitosis</u>			
	≤3	49 (71%)	43 (47,2%)	36 (53,7%)
	4-6	9 (13%)	22 (24,2%)	11 (16,4%)
	7-9	2 (2,9%)	13 (14,3%)	10 (14,9%)
	10-19	7 (10,1%)	12 (13,1%)	7 (10,5%)
≥20	2 (2,9%)	1 (1,1%)	3 (4,5%)	
Capacidad invasiva	<u>Reacción estromal</u>			
	-	20(29%)	27 (29,7%)	21 (31,3%)
	+	36 (52,2%)	48 (52,7%)	32 (47,8%)
	++	8 (11,6%)	9 (9,9%)	12 (17,9%)
+++	5 (7,2%)	7 (7,7%)	2 (3%)	

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva.

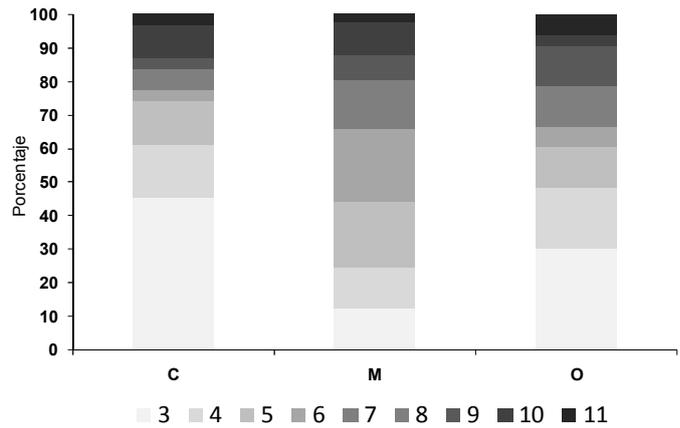
Se determinó que los adenocarcinomas seguían un patrón cribiforme, asociado o no a zonas de arquitectura papilar. El grupo de dieta hiperlipídica de maíz mostró una mayor agresividad histológica y actividad mitótica, seguido del grupo O. Asimismo, los tres grupos experimentales presentaron una nula o leve reacción estromal (Tabla 10).

Por otro lado, se determinó la escala *Scarff-Bloom-Richardson* (SBR), que mide el grado tumoral en tumores mamarios de rata. Se pudo observar que los adenocarcinomas del grupo M tendían a presentar mayor grado que los del grupo C aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $0.05 < p < 0.1$ ) (Figura 15).

*Resultados*

**A**

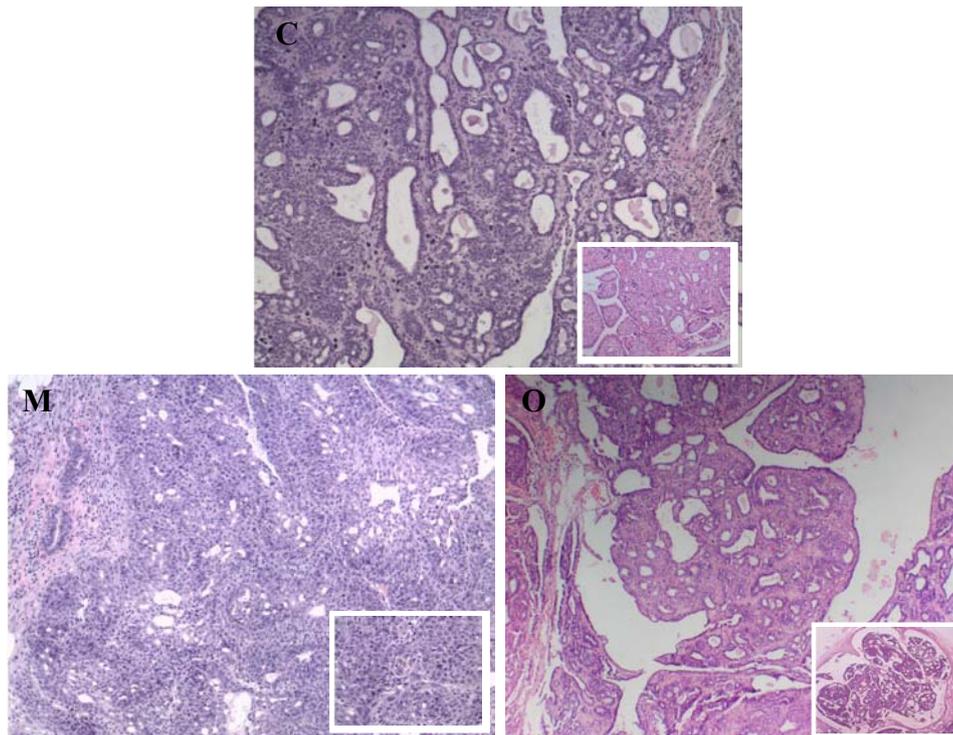
SBR11			
GRADOS	C	GRUPO	
		M	O
3	14 (45,16%)	5 (12,2%)	10 (30,3%)
4	5 (16,1%)	5 (12,2%)	6 (18,18%)
5	4 (12,90%)	8 (19,51%)	4 (12,12%)
6	1 (3,22%)	9 (21,95%)	2 (6,06%)
7	1 (3,22%)	3 (7,31%)	3 (9,1%)
8	1 (3,22%)	3 (7,31%)	1 (3,03%)
9	1 (3,22%)	3 (7,31%)	4 (12,12%)
10	3 (9,68%)	4 (9,75%)	1 (3,03%)
11	1 (3,22%)	1 (2,43%)	2 (6,06%)
TOTAL	31 (100%)	41 (100%)	33 (100%)



**B**

Grupos comparados	$\chi^2$ observada	$\chi^2$ teórica	Significación
C/M	14,021	15,51	0,05<p<0,1
C/O	5,167	15,51	NDS
M/O	10,075	15,51	NDS

**C**



**Figura 15. Análisis del grado de malignidad de los adenocarcinomas mamarios experimentales mediante la escala Scarff-Bloom-Richardson adaptada a la rata (A y B) e imágenes histopatológicas representativas (C). SBR11: escala Scarff-Bloom-Richardson con 11 puntos; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. Aumento 40X; área fotografiada mostrada en el margen inferior derecho de cada imagen a 100X (grupo C), 200X (grupo M) y 400X (grupo O).**

### 3. PARÁMETROS DE LA CARCINOGENESIS

#### 3.1 Tiempo de latencia

El tiempo medio de latencia de los adenocarcinomas mamarios en los animales de los grupos C y O fue mayor que el del grupo M. Las diferencias estuvieron cercanas a la significación estadística (Tabla 11).

**Tabla 11. Análisis del tiempo medio de latencia de los adenocarcinomas de los diferentes grupos experimentales.**

<b>A</b>				
	C	M	O	
n	14	18	16	
M	102,5	77,28	102,25	
SD	42,3	32,1	47,42	
CV	41,27	41,53	46,38	
m	103	73	109	
<b>B</b>				
Grupos comparados	n	U	Z	Significación
C/M	14/18	79,5	1,77	0,05<p<0,1
C/O	14/16	105,5	0,27	NDS
M/O	18/16	95	1,69	0,05<p<0,1

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana; U y Z: test de la U de Mann Whitney; NDS: sin diferencias significativas.

#### 3.2 Incidencia

La incidencia de afectación se define como la relación entre el número de animales que presentan uno o más adenocarcinomas respecto al total de animales de su grupo. Su análisis constó de dos partes: 1) el estudio temporal, a partir de los datos observados en cada palpación, y 2) el estudio puntual, con los datos obtenidos en el momento del sacrificio.

Los resultados mostraron que la incidencia aumentó a lo largo del estudio en todos los grupos (Figura 16A). La curva del grupo de dieta hiperlipídica de maíz mostró una pendiente mayor en relación al grupo control y al de dieta de aceite de oliva. Por otra parte, mientras que en el grupo M dicho parámetro empezó a estabilizarse alrededor del día 140 post-inducción, tanto en el grupo C como en el grupo O este hecho sucedió más tarde.

Cuantitativamente, el grupo M fue el que mayor número de animales afectados presentó a lo largo de todo el ensayo seguido, en menor grado, del grupo de dieta hiperlipídica de oliva. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 16A y Tabla 12B).

En este momento las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas (Tabla 12C).

Los valores de la incidencia obtenidos en el momento del sacrificio para cada grupo se muestran en la tabla 12A.

**Tabla 12. Estudio temporal y en el sacrificio de la incidencia de adenocarcinomas mamarios experimentales.**

A	Número de animales afectados/total (%)		
	C	M	O
	14/20 (70%)	18/20 (90%)	16/20 (80%)

B	Grupos comparados		S	Significación
	C/M		24	p<0,0001
	C/O		11,84	p<0,001
	M/O		24	p<0,0001

C	Grupos comparados		$\chi^2$ observada	$\chi^2$ teórica	Significación
	C/M		0,28	3,841	NDS
	C/O		0,08	3,841	NDS
	M/O		0,06	3,841	NDS

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; S: "S" de Fierdman;  $\chi^2$ : test de la ji-cuadrado; NDS: sin diferencias significativas.

### 3.3 Contenido tumoral total

El contenido tumoral total se define como el número total de adenocarcinomas mamarios por grupo experimental.

A lo largo del ensayo se observó un aumento de dicho parámetro en todos los grupos experimentales, siendo la evolución de las curvas similar en todos ellos (Figura 16B). El número total de tumores del grupo O fue inferior al del grupo C y grupo M. Asimismo, el contenido tumoral del grupo de dieta normolipídica fue inferior al del grupo de aceite de maíz. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas en todos los casos (Tabla 13B).

La cantidad total de tumores obtenidos en el momento del sacrificio para cada grupo experimental se muestran en la tabla 13A. En este momento, las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas (Tabla 13C).

**Tabla 13. Estudio temporal del contenido tumoral.**

A			
Contenido tumoral total			
C	M	O	
72	95	69	

B			
Grupos comparados	S	Significación	
C/M	18,18	p<0,0001	
C/O	18,18	p<0,0001	
M/O	24	p<0,0001	

C			
Grupos comparados	$\chi^2$ observada	$\chi^2$ teórica	Significación
C/M	1,59	3,841	NDS
C/O	0,03	3,841	NDS
M/O	2,07	3,841	NDS

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; S: "S" de Fierdman;  $\chi^2$ : test de la ji-cuadrado; NDS: sin diferencias significativas.

### 3.4 Volumen tumoral total

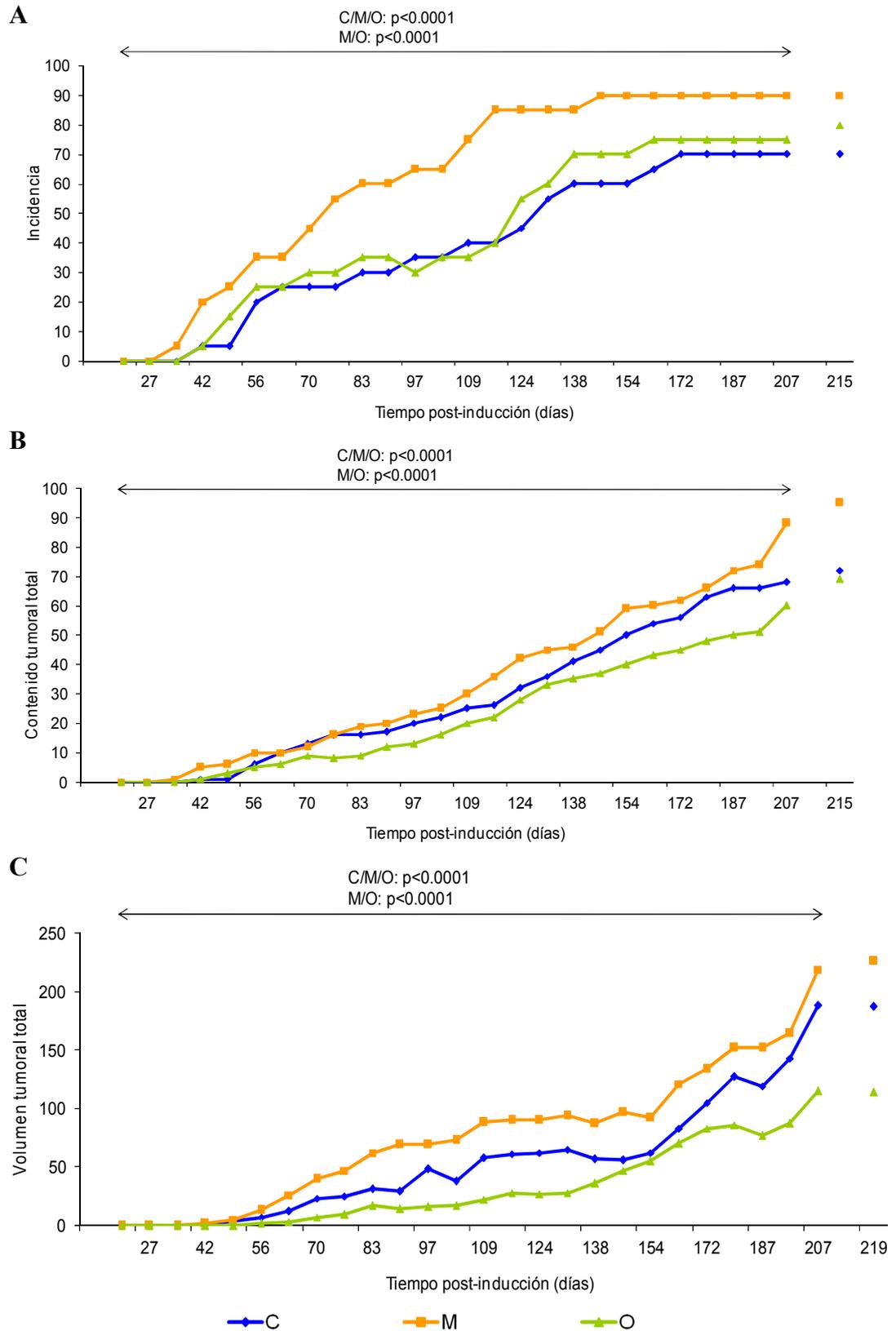
El análisis de la evolución del volumen tumoral a lo largo del tiempo permitió hacer el seguimiento del crecimiento tumoral. El volumen tumoral se calculó a partir de los dos diámetros mayores (D1 y D2) de cada tumor, determinados durante las palpaciones periódicas. Se aplicó la fórmula del volumen del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

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

En el momento del sacrificio no se pudo realizar el análisis estadístico porque sólo existía un único dato por grupo.

Las diferentes curvas obtenidas para el volumen tumoral total de los tres grupos experimentales muestran una evolución aproximadamente de tipo lineal a lo largo del ensayo, aunque su pendiente es superior durante el último tercio de éste (Figura 16C).

*Resultados*



**Figura 16. Parámetros de la carcinogénesis. A: Incidencia; B: Contenido tumoral total; C: Volumen tumoral total. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva.**

Cuantitativamente, tal y como se puede observar en la curva y como ya sucedió anteriormente con el contenido tumoral total, el volumen tumoral total fue inferior en el grupo de aceite de oliva respecto al grupo C y al grupo M, mostrando éste último los mayores valores de dicho parámetro de la carcinogénesis (tabla 14B). Los valores del volumen tumoral total de los diferentes grupos en el momento del sacrificio se muestran en la tabla 14A.

**Tabla 14. Estudio temporal del volumen tumoral total.**

<b>A</b>			
Volumen tumoral total (cc)			
C	M	O	
116	145,5	56,16	

<b>B</b>			
Grupos comparados	S	Significación	
C/M	24	p<0,0001	
C/O	23	p<0,0001	
M/O	24	p<0,0001	

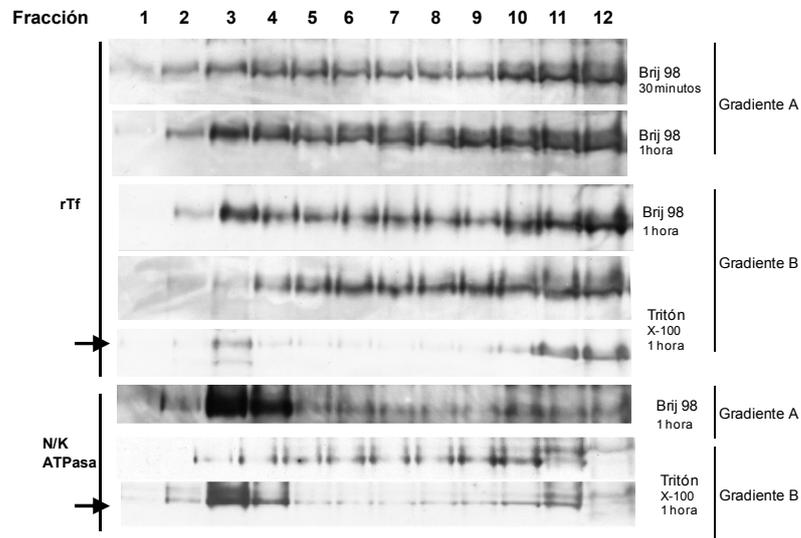
C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; S: "S" de Friedman; cc: centímetros cúbicos.

## **B. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE AISLAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA EN HÍGADO DE RATA Y VALIDACIÓN EN ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES**

Para llevar a cabo el estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre la composición de la membrana en los adenocarcinomas mamarios experimentales, previamente hubo que realizar la puesta a punto de un método de aislamiento de dominios de membrana en tejido de rata. Dicho método se basa en la insolubilidad de los LR en un detergente no iónico.

Dado que las características bioquímicas de las DRMs varían en función del detergente utilizado para su obtención, se realizaron diferentes ensayos con el fin de optimizar dicha técnica. Para ello se utilizaron dos tampones de homogenización que diferían en su composición en detergente no iónico: Tritón X-100 o Brij98 (Figura 17). Asimismo, la estandarización implicó ensayar diferentes volúmenes de los mismos y diferentes cantidades

de muestra. También se probaron distintas proporciones de sacarosa para optimizar la separación de las membranas en el gradiente. Finalmente, las DRMs se purificaron tras una ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa que constaba de 41%, 36% y 15% de la misma.



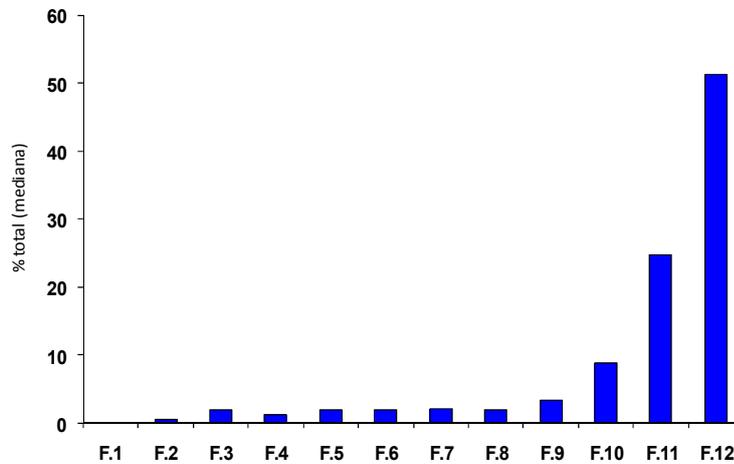
**Figura 17. Análisis por Western blot de los marcadores de membrana soluble Receptor de Transferrina (rTf) y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa  $\alpha$ -1.** Las muestras de hígado se homogenizaron en tampón conteniendo detergente y, posteriormente, se realizó el gradiente de sacarosa para aislar los LR según “Materiales y Métodos”. En 1-12 se representan las fracciones del gradiente desde la parte superior hasta la inferior del tubo. Gradiente A: 2,5 mL sacarosa 15%/ 7 mL sacarosa 36%/ 2,5 mL muestra-sacarosa 41%; Gradiente B: 1,5 mL sacarosa 15%/ 8 mL sacarosa 36%/ 2,5 mL muestra-sacarosa 41%. Flecha: 10 volúmenes de tampón de homogenización en lugar de 8 (resto de ensayos). La flecha indica las condiciones elegidas para desarrollar la técnica en los diferentes grupos.

Al final del proceso se obtuvieron 12 fracciones, cada una de 1 mL. La fracción 1 correspondía a la primera fracción recogida desde la parte superior del tubo y la 12 a la última, en el fondo del tubo. En tejido hepático, las DRMs se visualizaron como un "halo" de color marronoso y con aspecto grumoso en la interfase 36%-15% del gradiente de sacarosa.

Una vez extraídas las diferentes fracciones de membrana en hígado, se procedió a su caracterización. Para ello, en cada una de ellas se determinaron: 1) la concentración de proteínas totales, 2) la cantidad de colesterol y 3) la presencia de proteínas específicas de cada dominio de la membrana.

En cuanto al contenido en proteínas totales, alrededor del 85% de éstas se presentó en las fracciones 10, 11 y 12 (las de mayor densidad), mientras que un 4% aproximadamente se

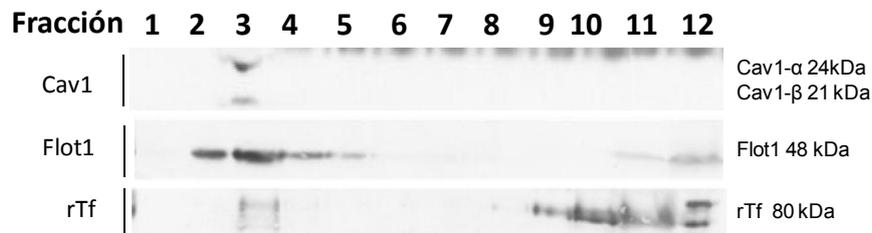
detectó en la fracción 3. El resto de fracciones presentaron un nivel muy bajo de proteínas totales (Figura 18).



**Figura 18. Caracterización del contenido en proteínas totales de las fracciones de membrana en hígado.** F.1 a F.12: fracción 1 a fracción 12.

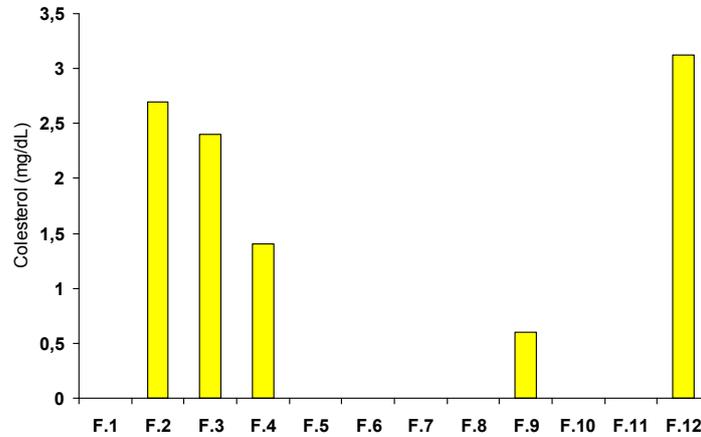
La caracterización de las distintas fracciones de membrana también se realizó mediante el análisis de la expresión de diferentes proteínas marcadoras de cada una de dichas fracciones: Flot1, una proteína residente y formadora de LR; Cav1, proteína esencial para la formación de caveolas; y finalmente rTf, localizado en MS. Además, este análisis permitió evaluar la eficacia del método en la separación de las DRMs en el gradiente de sacarosa.

Tal y como se observa en la figura 19, Flot1 se detectó como una especie de unos 48 kDa en las fracciones 2 a 5, principalmente, mientras que Cav1 se presentó exclusivamente en la fracción 3, como un doblete de aproximadamente 24 y 21 kDa. Finalmente, rTf se detectó como una banda de unos 100 kDa en el resto de fracciones, sobre todo en las fracciones 10 a 12 y en mucha menor cantidad en la fracción 3.



**Figura 19. Caracterización de la expresión de proteínas marcadoras de las fracciones de membrana en hígado.** Cav1: Caveolina-1; Flot1: Flotilina-1; rTf: Receptor de transferrina.

Por otro lado, se observó una mayor cantidad de colesterol en la fracción 12, seguida de las fracciones de baja densidad 2, 3, 4, y finalmente, en menor cantidad, la fracción 9 (Figura 20).



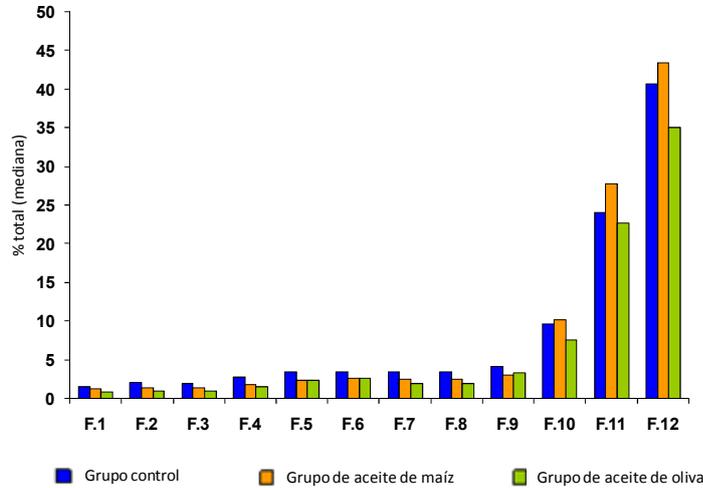
**Figura 20. Caracterización del contenido en colesterol de las fracciones de membrana en hígado.**  
F.1 a F.12: fracción 1 a fracción 12.

A partir de todos estos resultados se estableció que en hígado las fracciones de membrana 2 a 5 correspondían a LR, la fracción 3 correspondía a caveolas, y las fracciones 10, 11 y 12 representaban la MS.

Una vez estandarizado un método de aislamiento de dominios de membrana en hígado de rata, se procedió al análisis en las muestras del estudio, los adenocarcinomas mamarios. En primer lugar, se cuantificó el contenido en proteínas totales de las distintas fracciones obtenidas mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. A continuación, se procedió al estudio de la localización de las proteínas Flot1, Cav1 y rTf, consideradas marcadoras de los microdominios LR, caveolas y MS, respectivamente. Finalmente, se caracterizaron las diferentes fracciones de membrana por su contenido en Col y SM, lípidos característicos de LR y caveolas.

La cuantificación de la concentración de proteínas de cada una de las fracciones de membrana obtenidas en los adenocarcinomas mamarios de los tres grupos experimentales mostró una concentración creciente de proteínas a lo largo de las diferentes fracciones. Así, las primeras, consideradas como fracciones de baja densidad, presentaron una baja concentración de proteínas totales, mientras que las últimas, de alta densidad, presentaron una

concentración mayor, equivalente, aproximadamente, al 60% del total de proteínas de la membrana (Figura 21).

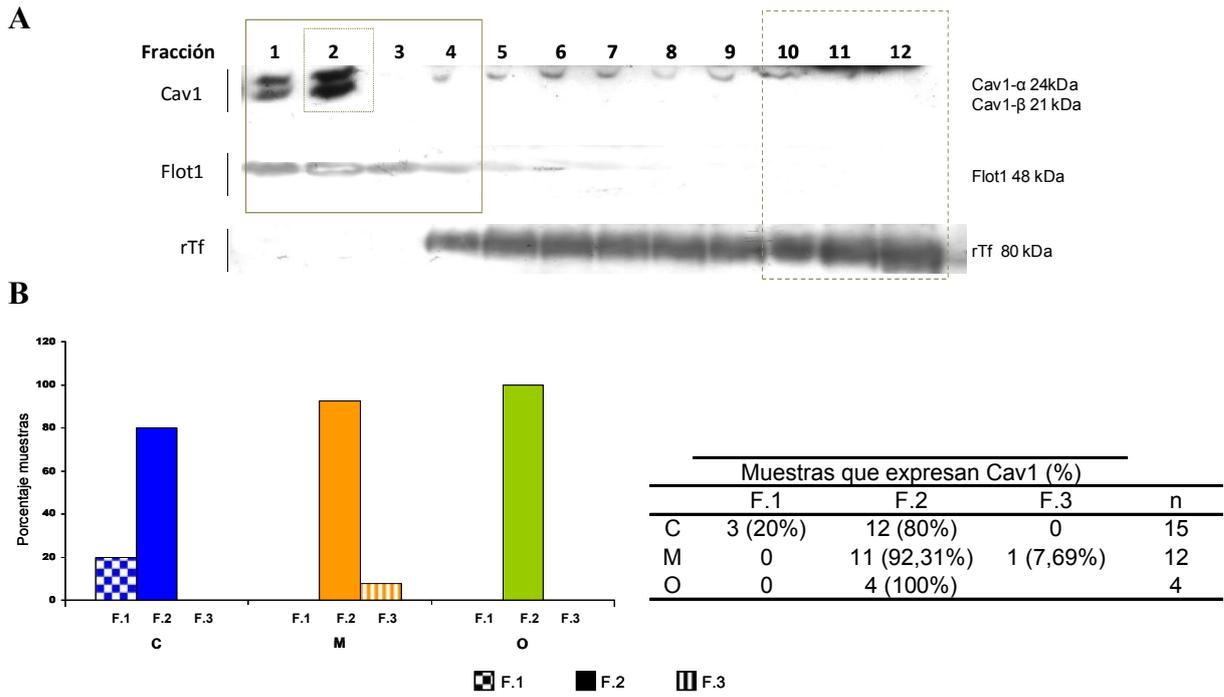


**Figura 21. Caracterización del contenido en proteínas totales de las fracciones de membrana de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. F.1 a F.12: fracción 1 a fracción 12.**

En cuanto a la localización de proteínas marcadoras, el análisis de la expresión de Flot1 en cada una de las 12 fracciones de membrana obtenidas permitió identificar las fracciones 1, 2, 3 y 4 con expresión claramente positiva y mayoritaria para dicha proteína (Figura 22A). Consecuentemente, se estableció que estas cuatro fracciones correspondían al microdominio de LR. Dicho resultado se corroboró posteriormente con los obtenidos en la caracterización de lípidos. Por tanto, los estudios posteriores, tanto de expresión de dicha proteína como de niveles de lípidos, se realizaron con una mezcla de estas 4 fracciones a la que se denominó “*Pool de Lipid Rafts*”.

En relación a Cav1, en general ésta se localizó mayoritariamente en la fracción 2 de los adenocarcinomas mamarios (Figura 22A). Sin embargo, en un pequeño número de muestras, del grupo control y del grupo de aceite de maíz, se detectó principalmente en la fracción 1 ó en la 3, respectivamente (Figura 22B). De este modo, el estudio posterior de expresión se realizó con la fracción enriquecida en dicha proteína para cada muestra, que fue considerada como la fracción correspondiente a caveolas.

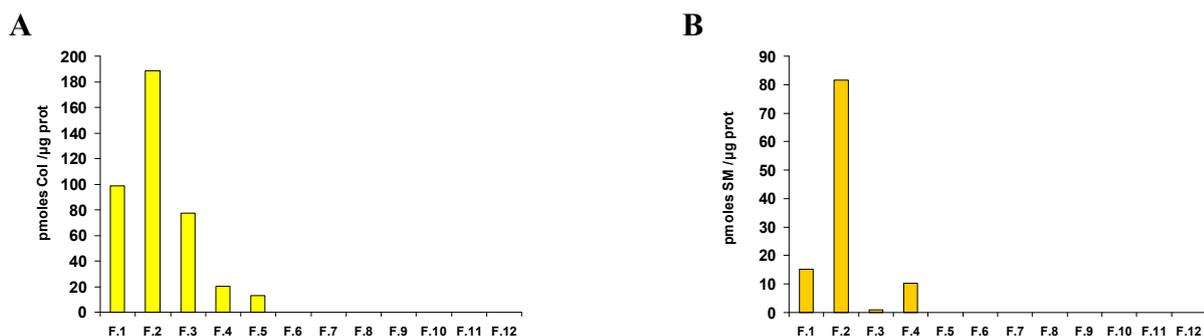
*Resultados*



**Figura22. Caracterización de la expresión de proteínas específicas de dominios de membrana de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. A:** Imagen representativa de Western Blot. **B:** Localización de Cav1 en las fracciones 1 a 3 y porcentaje de muestras con la fracción enriquecida en Cav1 en fracción 1, 2 o 3. Cav1: Caveolina-1; Flot1: Flotilina-1; rTf: Receptor de transferrina; F.1 a F.3: fracción 1 a fracción 3; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos.

Por otra parte, rTf se detectó en las fracciones 4 a 12, siendo 10, 11 y 12 las fracciones de mayor expresión de esta proteína. En consecuencia, se consideró que estas 3 fracciones estaban enriquecidas en membrana soluble (MS) y los estudios posteriores se efectuaron con una mezcla de estas 3 fracciones a la que se denominó "*Pool de Membrana Soluble*" (Figura 22A).

Finalmente, el análisis del contenido en Col y SM de las diferentes fracciones mostró que aquellas que por su contenido proteico se habían identificado como LR y caveolas (fracciones 1 a 4), también eran las fracciones más ricas en estos dos lípidos (Figura 23).



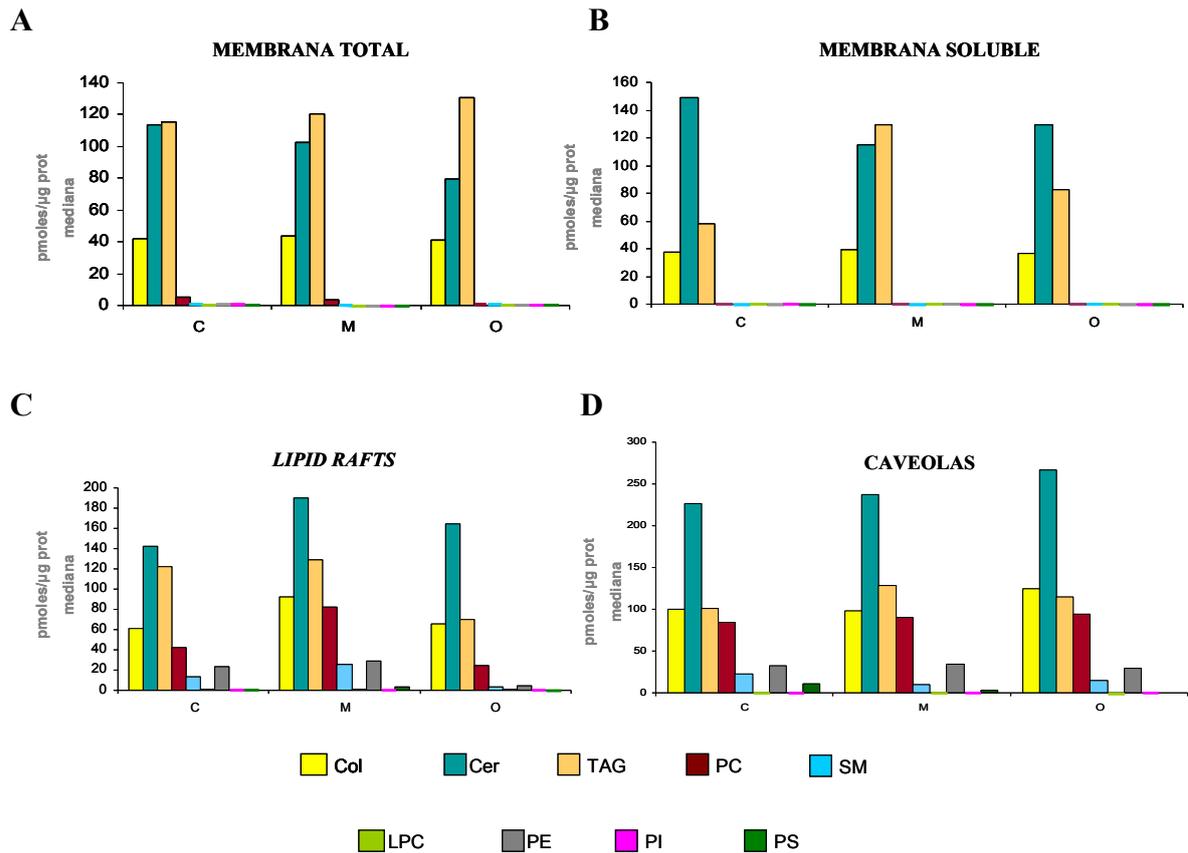
**Figura 23.** Contenido en (A) colesterol y (B) esfingomiélinea de las fracciones de membrana de los adenocarcinomas mamarios experimentales. Col: colesterol; SM: esfingomiélinea. F.1 a F.12: fracciones 1 a 12.

## **C. CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES**

### **1. COMPOSICIÓN EN TIPOS DE LÍPIDOS**

A partir de los extractos lipídicos obtenidos se procedió a la caracterización del tipo de lípidos presentes en las membranas tumorales mediante TLC. Así, se pudo cuantificar el contenido en esfingolípidos (Cer y SM), esteroides (Col), glicerofosfolípidos (LPC, PC, PE, PI y PS) y lípidos neutros (TAG), de membrana total, MS y de los microdominios LR y caveolas.

El análisis en membrana total mostró que los lípidos mayoritarios fueron los TAG, seguidos de Cer, Col y PC. El resto de lípidos estuvo en concentraciones por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica (Figura 24A). Dicho perfil se mantuvo con independencia del grupo experimental. Las diferencias observadas entre tipos de lípidos en cada grupo experimental fueron estadísticamente significativas, excepto la comparación entre TAG y Cer en los grupos C y M (Tabla 15).



**Figura 24. Caracterización del contenido lipídico de membrana total y sus dominios en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. A.** Membrana total. **B.** Membrana soluble (*pool* de fracciones 10, 11 y 12). **C.** *Lipid Rafts* (*pool* de fracciones 1, 2, 3 y 4) **D.** Caveolas. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; Col: colesterol; Cer: ceramida; TAG: triacilglicéridos; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina; LPC; lisofosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina.

Por otro lado, en MS, tanto el grupo control como el de aceite de oliva presentaron un perfil lipídico en el que Cer fue el lípido mayoritario, seguido de TAG y Col. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en ambos grupos. El grupo de aceite de maíz mostró un enriquecimiento significativo en TAG, de manera que éste fue el lípido mayoritario en este grupo, seguido de Cer y Col (Figura 24B y Tabla 15).

Resultados

**Tabla 15. Análisis estadístico de las diferencias en el contenido lipídico de membrana total y sus dominios en adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales.**

MEMBRANA TOTAL										
		Esfingolipidos		Esteroles	Glicerofosfolipidos		Lípidos neutros			
		Cer		Col	PC	TAG				
Esfingolipidos	Cer	C	-							
		M	-							
		O	-							
Esteroles	Col	C	0,011	-						
		M	0,001	-						
		O	0,001	-						
Glicerofosfolipidos	PC	C	0,000	0,000	-					
		M	0,000	0,001	-					
		O	0,000	0,000	-					
Lípidos neutros	TAG	C	NDS	0,000	0,000	-				
		M	NDS	0,001	0,000	-				
		O	0,002	0,000	0,000	-				

MEMBRANA SOLUBLE										
		Esfingolipidos		Esteroles	Glicerofosfolipidos			Lípidos neutros		
		Cer		Col	PC	TAG				
Esfingolipidos	Cer	C	-							
		M	-							
		O	-							
Esteroles	Col	C	0,000	-						
		M	0,001	-						
		O	0,000	-						
Lípidos neutros	TAG	C	0,000	0,015	-					
		M	NDS	NDS	-					
		O	0,028	0,051	-					

LIPID RAFTS										
		Esfingolipidos		Esteroles	Glicerofosfolipidos				Lípidos neutros	
		Cer	SM	Col	LPC	PC	PE	PI	PS	TAG
Esfingolipidos	Cer	C	-							
		M	-							
		O	-							
Esteroles	Col	C	0,000	0,000	-					
		M	0,005	0,001	-					
		O	0,009	0,001	-					
Glicerofosfolipidos	LPC	C	0,000	0,000	0,000	-				
		M	0,000	0,001	0,000	-				
		O	0,000	0,032	0,000	-				
	PC	C	0,000	0,000	NDS	0,000	-			
		M	0,000	0,011	NDS	0,000	-			
		O	0,001	0,018	0,093	0,001	-			
	PE	C	0,000	0,01	0,000	0,000	0,000	-		
		M	0,000	NDS	0,000	0,000	0,004	-		
		O	0,000	NDS	0,000	NDS	0,044	-		
	PI	C	0,000	0,000	0,000	NDS	0,000	0,000	-	
		M	0,000	0,002	0,000	NDS	0,000	0,000	-	
		O	0,000	0,002	0,000	NDS	0,000	0,049	-	
Lípidos neutros	TAG	C	0,000	0,013	0,000	NDS	0,000	0,000	NDS	-
		M	0,000	0,006	0,000	NDS	0,000	0,000	NDS	-
		O	0,000	0,002	0,000	NDS	0,000	0,049	NDS	-
Lípidos neutros	TAG	C	NDS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
		M	0,073	0,000	NDS	0,000	0,043	0,000	0,000	-
		O	0,021	0,000	NDS	0,000	0,024	0,000	0,000	-

CAVEOLAS									
		Esfingolipidos		Esteroles	Glicerofosfolipidos			Lípidos neutros	
		Cer	SM	Col	PC	PE	PS	TAG	
Esfingolipidos	Cer	C	-						
		M	-						
		O	-						
Esteroles	Col	C	0,000	0,000	-				
		M	NDS	0,001	-				
		O	0,000	0,000	-				
Glicerofosfolipidos	PC	C	0,000	0,000	NDS	-			
		M	0,000	0,001	NDS	-			
		O	0,000	0,000	0,018	-			
	PE	C	0,000	0,093	0,000	0,000	-		
		M	0,000	NDS	0,004	0,009	-		
		O	0,000	0,064	0,000	0,000	-		
Lípidos neutros	TAG	C	0,001	0,000	NDS	NDS	0,000	0,000	-
		M	NDS	0,001	NDS	NDS	0,004	0,001	-
		O	0,001	0,007	NDS	NDS	0,073	0,000	-

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; Cer: ceramida; SM: esfingomielina; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; El nivel de significación se estableció para  $p \leq 0,05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney; NDS: sin diferencias estadísticamente significativas.

El análisis de LR mostró un perfil similar en los 3 grupos, sobre todo en los lípidos mayoritarios, siendo Cer el más abundante, seguido de TAG, Col, PC, PE, SM, LPC, PS y PI. El grupo M presentó, dentro de las tres clases lipídicas minoritarias, una mayor cantidad de PS respecto a LPC y PI (Figura 24C). La mayoría de las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 15).

En caveolas se halló un perfil lipídico muy parecido al obtenido en LR, de manera que Cer también fue el lípido mayoritario, seguido de TAG o Col, PC, PE, SM y PS (Figura 24D) -véase análisis estadístico de las diferencias en la tabla 15-.

Al comparar el contenido de cada uno de estos lípidos entre los diferentes dominios de membrana para cada grupo experimental (Figura 25), los resultados mostraron que el contenido de esfingolípidos (Cer y SM) fue, generalmente, mayor en caveolas que en el resto de dominios. El grupo C presentó más cantidad de Cer en caveolas que en LR y MS ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, el grupo M mostró una mayor abundancia de dicho lípido en caveolas respecto a LR y en este último respecto a MS, mientras que en el grupo O solamente se hallaron unos niveles de Cer significativamente más altos en caveolas respecto a MS (Figura 25A). Asimismo, el grupo C y el grupo O presentaron unos niveles mayores de SM en caveolas y LR respecto a MS ( $p < 0.05$ ), y además el grupo C mostró un aumento significativo de este lípido en caveolas respecto a LR (Figura 25B). Por su parte, el grupo M mostró una mayor cantidad de SM en LR que en caveolas y en estas últimas respecto a MS.

En cuanto a Col, éste presentó la misma distribución en los 3 grupos experimentales, de manera que se detectaron mayores niveles de este lípido en caveolas que en LR y MS ( $p < 0.05$ ). Además, los niveles de Col en LR también fueron significativamente mayores que en MS (Figura 25C).

La LPC únicamente fue detectable en LR. En el resto de dominios y fracciones de membrana su abundancia relativa estuvo por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica y no pudo detectarse (Figura 25D).

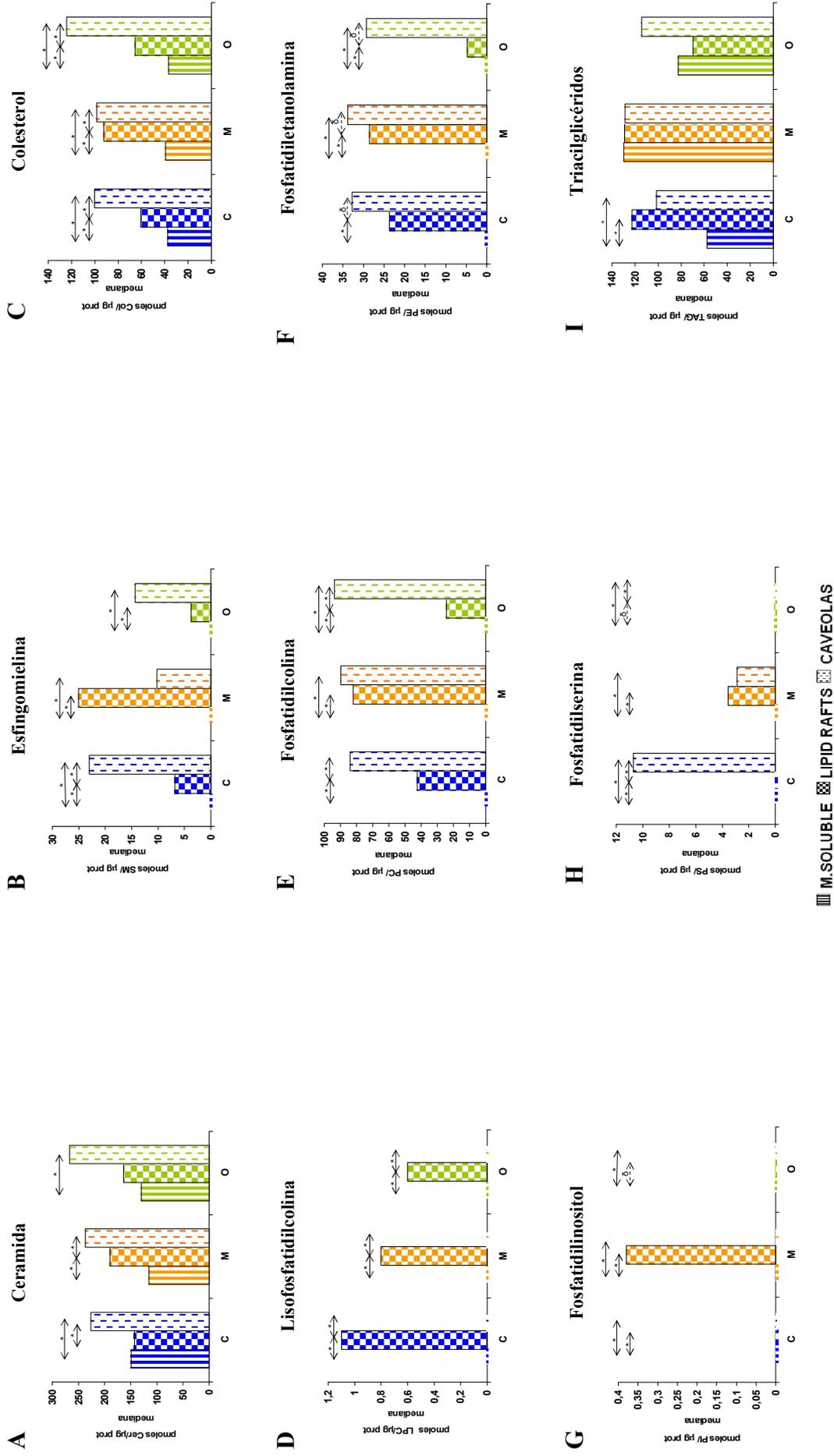
En relación a los glicerofosfolípidos mayoritarios, tanto PC como PE solamente fueron cuantificables en LR y caveolas. Los niveles de PC fueron significativamente mayores en caveolas que en LR en el grupo control y en el de aceite de oliva (Figura 25E), mientras que los de PE tendieron a ser mayores en caveolas en los 3 grupos experimentales (Figura 25F). Por otro lado, PI únicamente se detectó en el grupo M, concretamente en LR, y PS sólo en

### Resultados

caveolas en los grupos C y M, así como en LR en este último grupo (Figura 25G y Figura 25H)

En cuanto a los lípidos neutros, los TAG presentaron valores similares en las diferentes fracciones de membrana en los dos grupos de dieta hiperlipídica, a diferencia del grupo control que presentó niveles significativamente mayores en caveolas y LR respecto a MS (Figura 25I).

Resultados

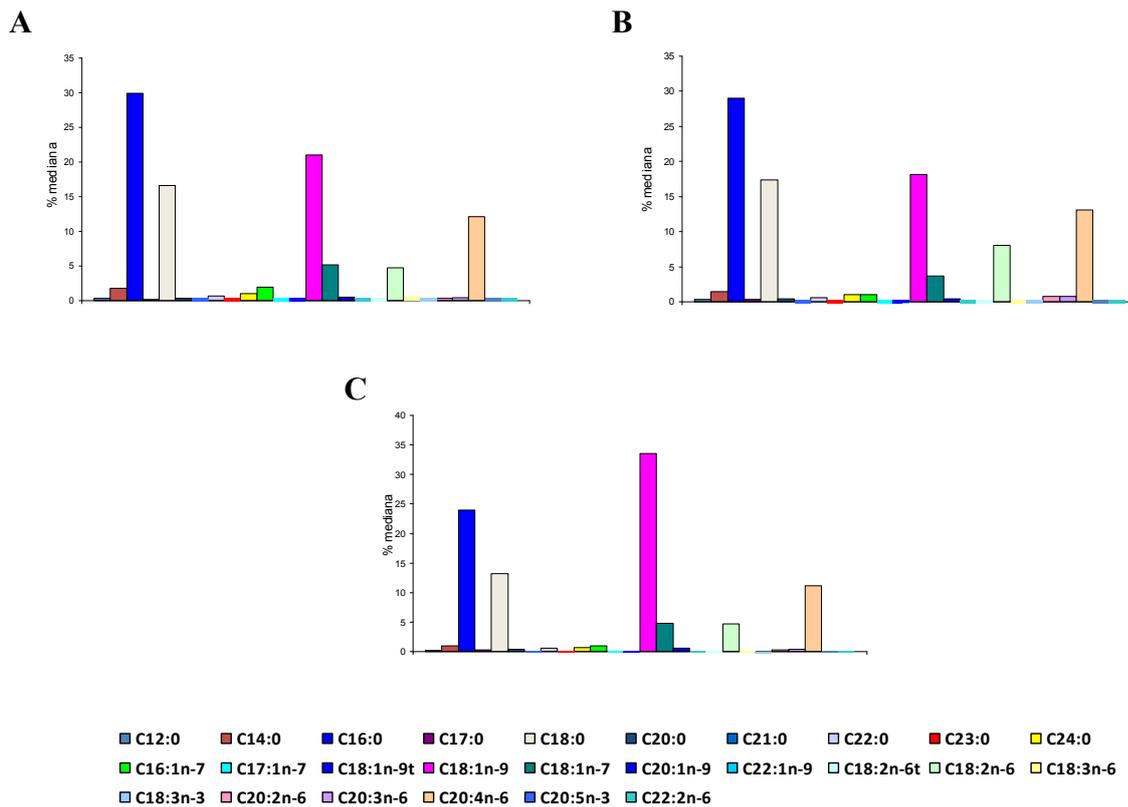


**Figura 25.** Contenido lipídico de los diferentes dominios de membrana de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. A: ceramida; B: esfingomielina; C: colesterol; D: lisofosfatidilcolina; E: fosfatidilcolina; F: fosfatidiletanolamina; G: fosfatidilinositol; H: fosfatidilserina; I: triacilglicéridos. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; \* : $p \leq 0.05$ ,  $\delta$ : $0.05 > p > 0.1$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

## 2. COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS

### 2.1 Membrana total

A continuación, se analizó la composición en ácidos grasos de las membranas tumorales. En este caso, únicamente se pudieron analizar la membrana total y la MS por falta de disponibilidad de muestras de LR y caveolas. El contenido en ácidos grasos de la membrana total mostró un perfil similar en los tres grupos experimentales. En el grupo control y el grupo de aceite de maíz los ácidos grasos mayoritarios fueron C16:0, seguido de C18:1n-9, C18:0, C20:4n-6, C18:1n-7 ó C18:2n-6 (Figura 26A y Figura 26B). Por otra parte, el grupo de aceite de oliva mostró como ácido graso más abundante el C18:1n-9, seguido de C16:0, C18:0, C20:4n6 y C18:1n7. (Figura 26C).



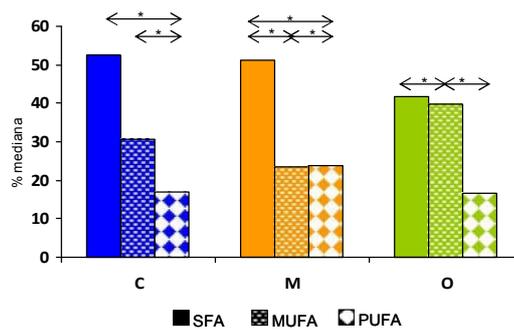
**Figura 26** Caracterización del contenido en ácidos grasos de membrana total en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. **A:** Perfil de ácidos grasos en el grupo C; **B:** Perfil de ácidos grasos en el grupo M; **C:** Perfil de ácidos grasos en el grupo O.

Los ácidos grasos minoritarios también fueron similares en los distintos grupos. Así, en el grupo control se determinaron mayores niveles de C16:1n-7, por delante de C14:0,

C24:0, C22:0, C20:1n-9, C20:3n-6, C20:2n-6, C20:0, C12:0 y C17:0. Entre los ácidos grasos cuyos niveles estuvieron por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica, estuvo C18:3n-3 (Figura 26A). Por otro lado, el grupo M presentó mayor abundancia de C14:0, seguido de C16:1n-7, C24:0, C20:3n-6, C20:2n-6, C22:0, C20:1n-9, C20:0, C12:0 y C17:0 (Figura 26B). Finalmente, el grupo de dieta de aceite de oliva mostró niveles mayores de C18:2n-6, seguido de C16:1n-7, C14:0, C24:0, C22:0, C20:1n-9, C20:3n-6, C20:0; C20:2n-6; C17:0; y finalmente C12:0 (Figura 26C). La mayoría de las diferencias observadas en el contenido de ácidos grasos en cada grupo experimental fueron estadísticamente significativas (Tabla 16).

Al analizar el contenido total en ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), los resultados mostraron que en el grupo C predominaban los SFA, con valores similares a los MUFA, y que ambos presentaban niveles significativamente mayores en relación a los PUFA (Figura 27). El grupo M también mostró una mayor abundancia de SFA que de MUFA y PUFA, siendo el contenido de estos últimos mayor que el de MUFA. En el grupo O, los niveles de SFA fueron mayores que los de MUFA y éstos a su vez que los de PUFA.

	SFA			MUFA			PUFA		
	C	M	O	C	M	O	C	M	O
n	23	13	12	23	13	12	23	13	12
M	51,98	50,7	42,37	30,05	25,03	40,87	17,96	24,27	16,76
SD	3,14	6,94	9,88	4,59	4,26	9,58	3,16	3,9	3,63
CV	6,03	13,68	23,31	15,29	17,02	23,45	17,57	16,08	21,68
m	52,38	51,34	41,89	30,53	23,64	39,73	17,08	23,69	16,49



**Figura 27:** Caracterización del contenido en ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de membrana total de adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana. \*:  $p \leq 0.05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

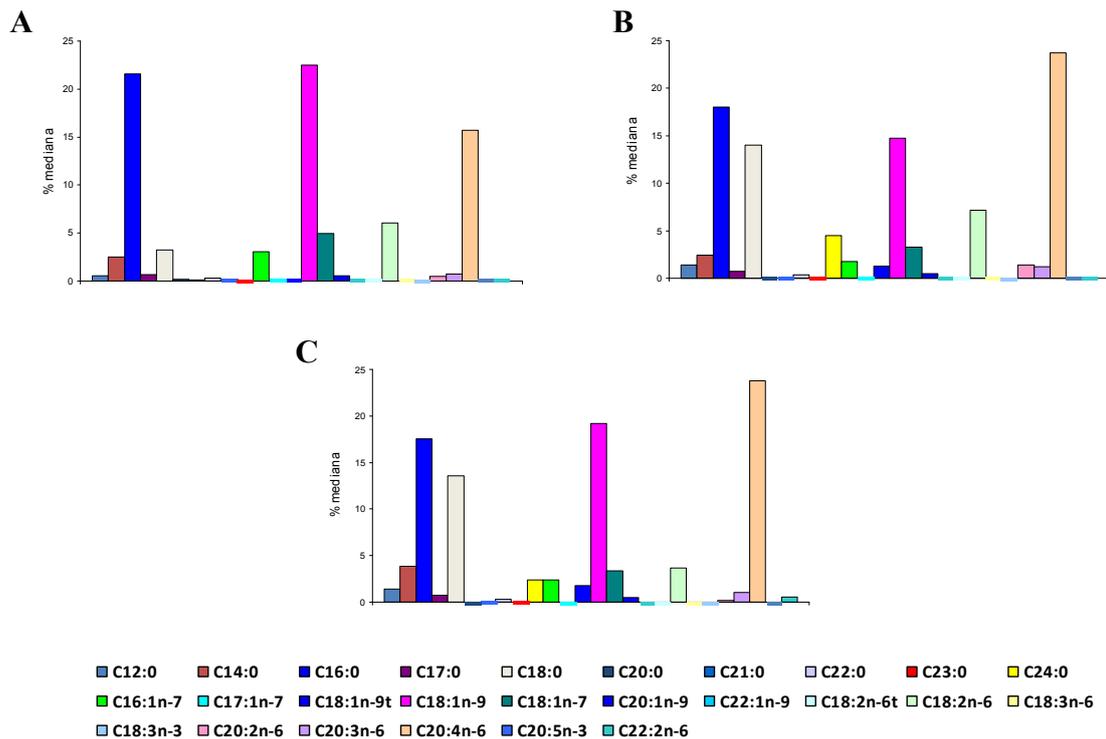
Tabla 16. Análisis estadístico de las diferencias en el contenido en ácidos grasos de la membrana total en adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales.

		MEMBRANA TOTAL																
		SFA					MUFA					PUFA						
		Laurico C12:0	Mirístico C14:0	Palmitico C16:0	Margarico C17:0	Estearico C18:0	Arquidico C20:0	Balenico C22:0	Lignocérico C24:0	Palmitoleico C16:1n-7	Oleico C18:1n-9	Vaccenico C18:1n-7	Eicosasenoico C20:1n-9	Linoleico C18:2n-6	Linoléico C18:3 n-3	Eicosadienoico C20:2n-6	Eicosatrienoico C20:3 n-6	Arquidónico C20:4n-6
Laurico C12:0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mirístico C14:0	M	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Palmitico C16:0	M	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Margarico C17:0	M	0,007	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Estearico C18:0	M	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Arquidico C20:0	M	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Balénico C22:0	M	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Lignocérico C24:0	M	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,001	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Palmitoleico C16:1n-7	M	0,000	0,099	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Oleico C18:1n-9	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Vaccenico C18:1n-7	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Eicosasenoico C20:1n-9	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,015	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linoleico C18:2n-6	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Linoléico C18:3 n-3	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Eicosadienoico C20:2n-6	M	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Eicosatrienoico C20:3 n-6	M	0,04	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Arquidónico C20:4n-6	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. El nivel de significación se estableció para  $p \leq 0,05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney; NDS: sin diferencias estadísticamente significativas.

## 2.2 Membrana soluble

En relación a la membrana soluble, el perfil de ácidos grasos de cada grupo también mostró diferencias en cuanto a ácidos grasos mayoritarios. En el grupo control el ácido graso más abundante fue el C18:1n-9, seguido del C16:0, C20:4n-6, C18:2n-6, C18:1n-7, C18:0, C16:1n-7, C14:0, C20:3n-6, C17:0, C20:1n-9, C12:0, C20:2n-6 y, finalmente, los SFA C22:0, C20:0, C24:0, y el PUFA C18:3n-3 (Figura 28A). El grupo M mostró una mayor cantidad del PUFA C20:4n-6, por delante de C16:0, 18:1n-9, C18:0, C18:2n-6, C24:0, C18:1n-7, C14:0, C16:1n-7, C20:2n-6, C12:0, C20:3n-6, C17:0, C20:1n-9, C22:0, C20:0 y, finalmente, C18:3n-3 (Figura 28B). Por otro lado, en el grupo O el ácido graso más abundante fue el C20:4n-6, seguido de C18:1n-9, C16:0, C18:0, C14:0, C18:2n-6, C18:1n-7, C24:0, C12:0, C20:3n-6, C17:0, C20:1n-9, C22:0, C20:2n-6 y, por último, C20:0 y C18:3n-3 (Figura 28C). La mayoría de las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 17).



**Figura 28.** Caracterización del contenido en ácidos grasos de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. **A:** Perfil de ácidos grasos en el grupo C; **B:** Perfil de ácidos grasos en el grupo M; **C:** Perfil de ácidos grasos en el grupo O.

Tabla 17. Análisis estadístico de las diferencias en el contenido en ácidos grasos de la membrana soluble en adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales.

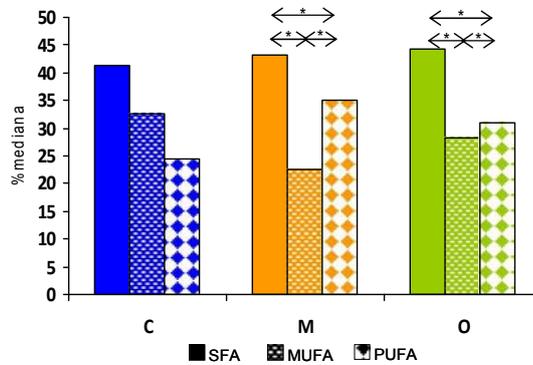
		MEMBRANA SOLUBLE																
		SFA						MUFA						PUFA				
		Laurico C12:0	Mirístico C14:0	Palmitico C16:0	Margarico C17:0	Estéarico C18:0	Arquíduico C20:0	Behénico C22:0	Lignocérico C24:0	Palmitoleico C16:1n-7	Oleico C18:1n-9	Vacénico C18:1n-7	Ecosenoico c20:1n-9	Linoleico C18:2n-6	Linoléico C18:3n-3	Ecosenoico C20:2n-6	Arquíduico C20:3n-6	Arquíduico C20:4n-6
Laurico C12:0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mirístico C14:0	M	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palmitico C16:0	M	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Margarico C17:0	M	0,003	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estéarico C18:0	M	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arquíduico C20:0	M	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Behénico C22:0	M	0,072	0,000	0,000	0,081	0,000	0,035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lignocérico C24:0	M	0,007	0,024	0,000	0,01	0,000	0,001	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,024	0,000	0,008	0,000	0,001	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palmitoleico C16:1n-7	M	0,035	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oleico C18:1n-9	M	0,000	0,000	0,005	0,000	0,073	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vacénico C18:1n-7	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Ecosenoico C20:1n-9	M	0,006	0,000	0,000	0,032	0,000	0,003	0,007	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-
	O	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,026	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-	-	-
Linoleico C18:2n-6	M	0,000	0,000	0,001	0,000	0,003	0,000	0,013	0,000	0,001	0,000	0,003	0,000	-	-	-	-	-
	O	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-	-
Linoléico C18:3n-3	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,091	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
	O	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-	-
Ecosenoico C20:2n-6	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037	0,000	0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
	O	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
Eicosatriénico C20:3n-6	M	0,000	0,000	0,000	0,078	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,006	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Arquíduico C20:4n-6	M	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	O	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. El nivel de significación se estableció para  $p \leq 0,05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney; NDS: sin diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

En membrana soluble también se analizaron los ácidos grasos en función de su grado de saturación. Mientras que el grupo control mostró una mayor cantidad de SFA que de MUFA y PUFA, aunque no de manera significativa, los grupos de dieta hiperlipídica mostraron el mismo perfil, siendo los SFA los más abundantes seguidos de los PUFA y, finalmente, los MUFA. En este caso todas las diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 29).

	SFA			MUFA			PUFA		
	C	M	O	C	M	O	C	M	O
n	21	14	11	21	14	11	21	14	11
M	41,02	42,07	43,26	34,89	23,38	26,98	24,09	34,55	29,76
SD	5,09	4,51	3,52	8,91	3,33	3,23	4,98	3,17	2,29
CV	12,4	10,72	8,14	25,53	14,24	11,97	2,68	9,17	7,69
m	41,4	43,29	44,21	32,72	22,55	28,38	24,4	34,93	30,94



**Figura 29.** Caracterización del contenido en ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) en membrana soluble de adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana. \*:p≤0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

## **D. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES**

Con el objetivo de investigar la posible influencia de los lípidos de la dieta sobre la composición, proteica y lipídica, de los dominios de la membrana de los tumores mamarios, se analizaron y compararon los niveles de las proteínas específicas de microdominios, así como de lípidos entre los distintos grupos experimentales (Objetivo 4).

### **1. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN PROTEICA**

#### **1.1 Flot1**

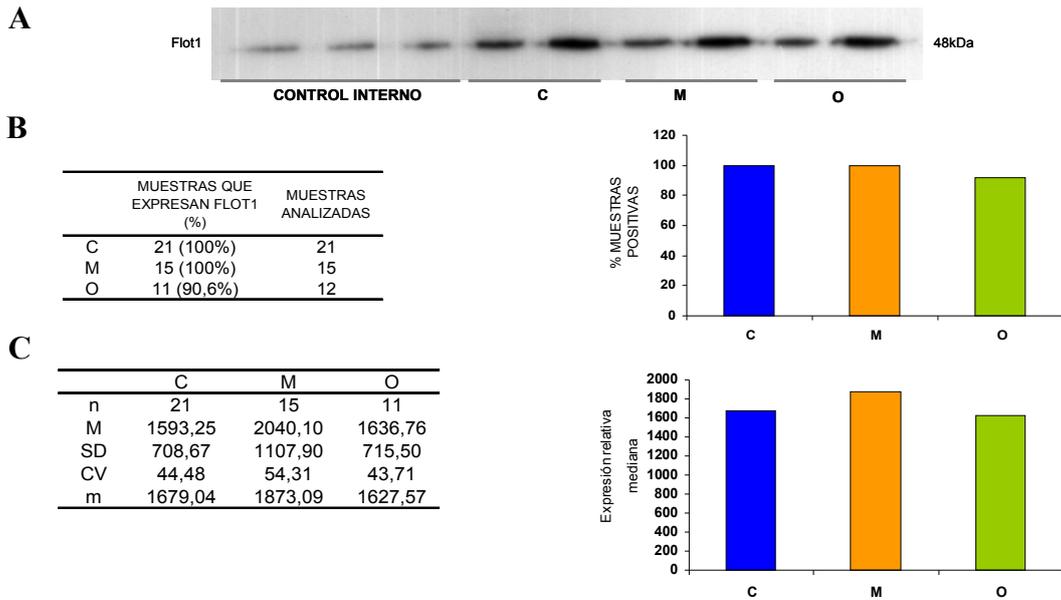
Los posibles cambios en los microdominios LR se determinaron mediante el análisis de la expresión de la proteína marcadora de dichos microdominios, Flot1 (Figura 30A). El análisis cualitativo mostró que el 100% de las muestras de los grupos C y M, y el 91% de las del grupo O expresaron Flot1. La diferencia observada en el grupo de aceite de oliva no fue estadísticamente significativa (Figura 30B).

Por otra parte, el análisis cuantitativo de la expresión de Flot1, considerando únicamente los tumores positivos para dicha proteína, indicó niveles similares entre los diferentes grupos experimentales (Figura 30C).

#### **1.2. Cav1**

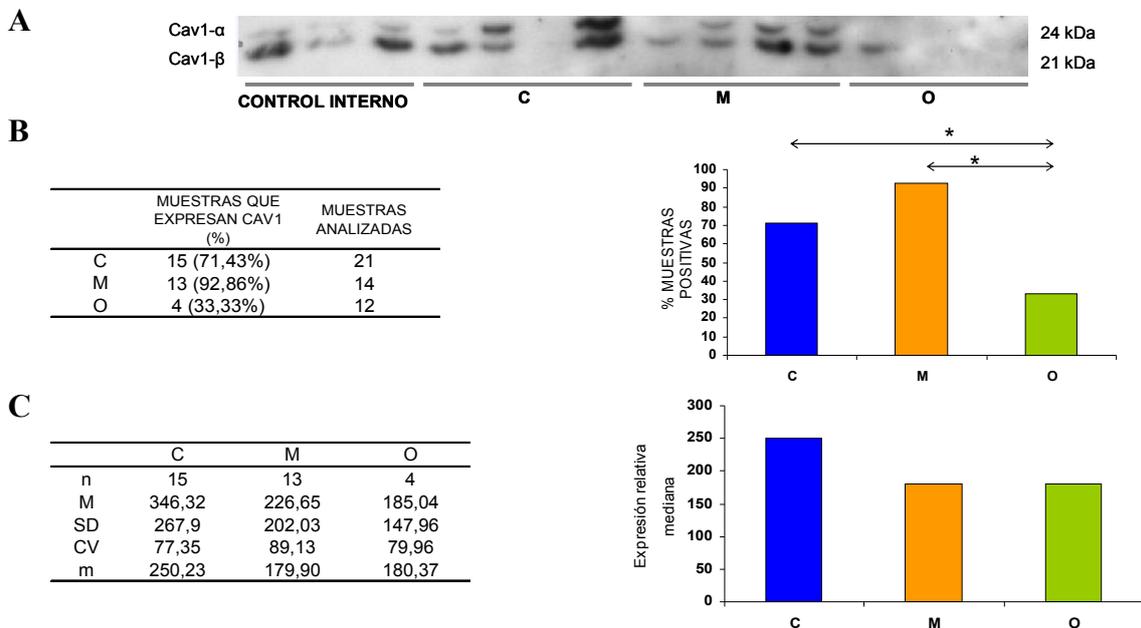
El análisis de los niveles de Cav1 en la fracción caracterizada previamente como la enriquecida en caveolas (1, 2, ó 3) mostró diferencias significativas en el número de muestras que expresaban Cav1. Así, en el grupo M el porcentaje de muestras que expresaban la proteína fue mayor que en el grupo O, el cual mostró el menor número de muestras con expresión de Cav1 (Figura 31B). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Resultados



**Figura 30. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de Flot1 en Lipid Rafts en adenocarcinomas mamarios experimentales.** **A:** Imagen representativa de Western Blot. **B:** Porcentaje de muestras positivas para Flot1. **C:** Expresión relativa de Flot1. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana.

Por otro lado, el estudio cuantitativo de los niveles relativos de Cav1 en las muestras con expresión de dicha proteína no mostró diferencias significativas entre los tres grupos experimentales (Figura 31C).



**Figura 31. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de Cav1 en caveolas en adenocarcinomas mamarios experimentales.** **A:** Imagen representativa de Western Blot. **B:** Porcentaje de muestras positivas para Cav1. **C:** Expresión relativa de Cav1. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana. \*:p≤ 0.05, test ji-cuadrado.

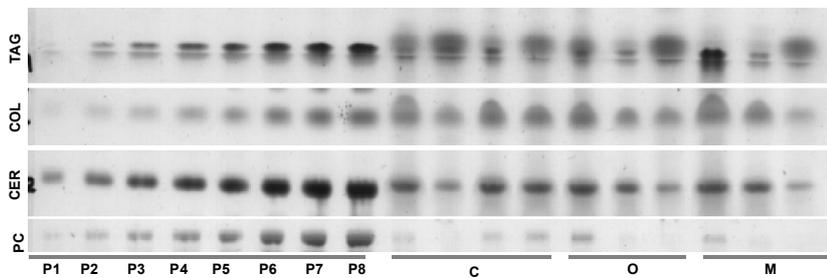
## 2. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA

### 2.1 Cambios en la composición de los diferentes tipos de lípidos

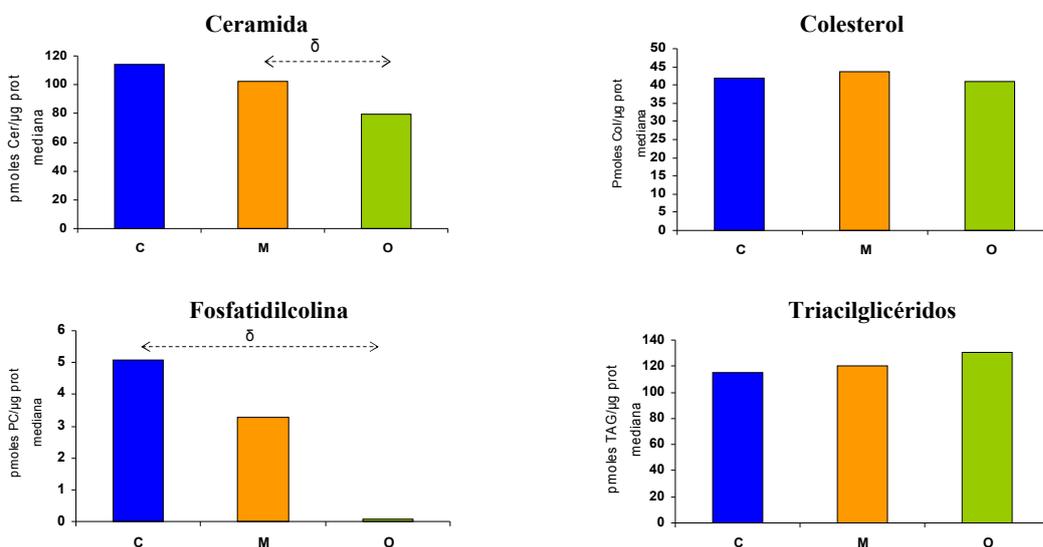
#### 2.1.1 Membrana total

En general, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de los diferentes tipos de lípidos analizados en membrana total. Únicamente la abundancia relativa de Cer, único esfingolípido detectado con la técnica utilizada en este trabajo, tendió a ser menor en el grupo de aceite de oliva respecto al de aceite de maíz. Los niveles de PC también mostraron una tendencia a la disminución en el grupo O respecto al control ( $0.05 < p < 0.1$ ) (Figura 32 y Tabla 18).

A



B



**Figura 32. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.** A: Imagen representativa de cromatografía en capa fina. B: Niveles relativos de lípidos. P1-P8: puntos de la recta patrón; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; Cer: ceramida; Col: colesterol; PC: fosfatidilcolina; TAG: triacilglicéridos.  $\delta: 0.05 > p > 0.1$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

**Tabla 18. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

	Esfingolípidos		Esteroles	Glicerofosfolípidos					Lípidos neutros	
	CER	SM	Col	LPC	PC	PE	PS	PI	TAG	
<b>C</b>	n	21	-	21	-	21	-	-	-	21
	M±SD	95,49±49,3	-	40,77±20,55	-	11,71±25,58	-	-	-	120,32±61,74
	CV	51,63	-	50,39	-	218,34	-	-	-	51,31
	m	113,83	-	41,99	-	5,08	-	-	-	114,92
	perc. 5-95	10,24-151,6	-	9,4-66,5	-	0-24,6	-	-	-	25,82-37,43
<b>M</b>	n	13	-	13	-	13	-	-	-	13
	M±SD	108,99±53,42	-	38,02±26,8	-	8,16±9,6	-	-	-	126,31±67,79
	CV	49,01	-	70,47	-	117,54	-	-	-	55,25
	m	102,16	-	43,55	-	3,29	-	-	-	120,27
	perc. 5-95	38,36-203,93	-	4,2-74,2	-	0,25-62	-	-	-	32,79-264,42
<b>O</b>	n	12	-	12	-	12	-	-	-	12
	M±SD	81,97±42,43	-	34,45±16,53	-	3,62±8,82	-	-	-	151,66±56,97
	CV	51,76	-	47,96	-	243,48	-	-	-	37,56
	m	79,78	-	40,88	-	0,07	-	-	-	130,58
	perc. 5-95	29,39-149,79	-	11,01-55,4	-	0-18,14	-	-	-	31,73-213,83

Cer: ceramida; SM: esfingomielina; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M±SD: media±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

### 2.1.2 Membrana soluble

En membrana soluble únicamente se obtuvieron niveles cuantificables de los lípidos Cer, Col y TAG. Los resultados mostraron que la abundancia relativa de Cer era mayor en el grupo control que en los grupos de dieta hiperlipídica. Por otra parte, los niveles de TAG y de colesterol fueron similares en los tres grupos, mostrando una tendencia al aumento en el grupo M respecto al control en ambos casos (Figura 33B y Tabla 19).

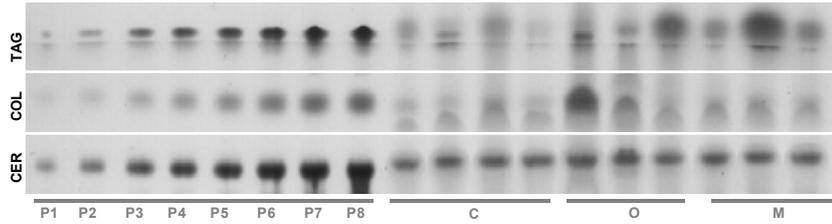
**Tabla 19. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

	Esfingolípidos		Esteroles	Glicerofosfolípidos					Lípidos neutros	
	CER	SM	Col	LPC	PC	PE	PS	PI	TAG	
<b>C</b>	n	21	-	21	-	-	-	-	-	21
	M±SD	146,36±51,12	-	36,08±51,12	-	-	-	-	-	69,59±48,92
	CV	34,92	-	68,91	-	-	-	-	-	70,32
	m	148,85	-	37,43	-	-	-	-	-	57,55
	perc. 5-95	29,26-194,6	-	7,21-63,16	-	-	-	-	-	46,51-254,02
<b>M</b>	n	13	-	13	-	-	-	-	-	13
	M±SD	123,19±38,87	-	69,47±71,59	-	-	-	-	-	125,48±92,56
	CV	31,55	-	102,66	-	-	-	-	-	73,76
	m	114,99	-	39,53	-	-	-	-	-	129,6
	perc. 5-95	74,46-176,83	-	29,42-203,91	-	-	-	-	-	39,67-216,88
<b>O</b>	n	12	-	12	-	-	-	-	-	12
	M±SD	128,42±38,39	-	38,86±12,47	-	-	-	-	-	94,18±67,98
	CV	29,89	-	32,08	-	-	-	-	-	72,17
	m	129,46	-	36,7	-	-	-	-	-	82,4
	perc. 5-95	74,94-177,51	-	26,8-59,2	-	-	-	-	-	85,16-240,38

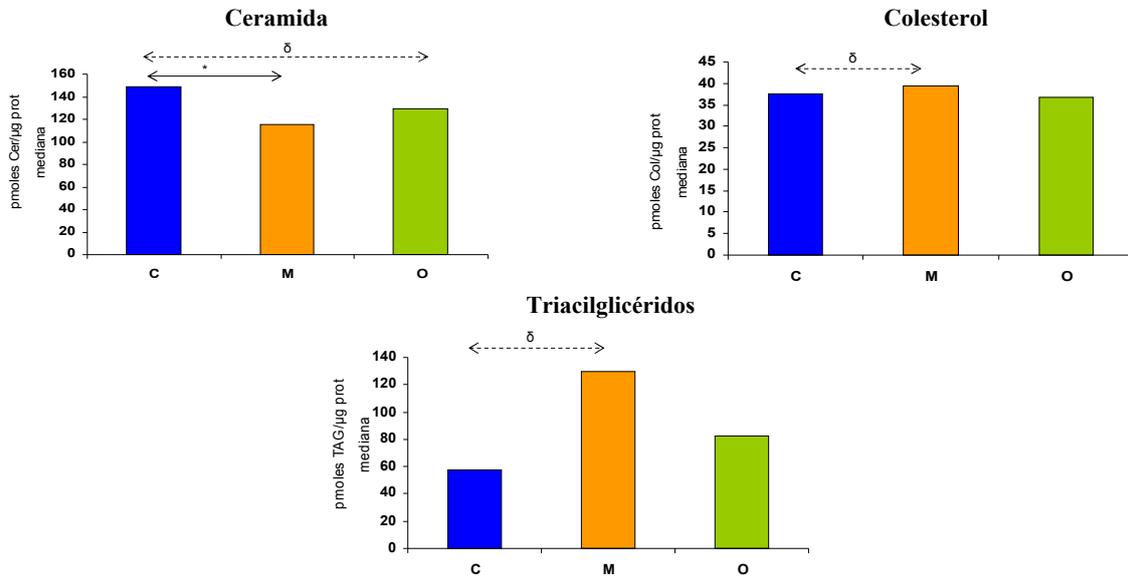
Cer: ceramida; SM: esfingomielina; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M±SD: media±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

## Resultados

A



B

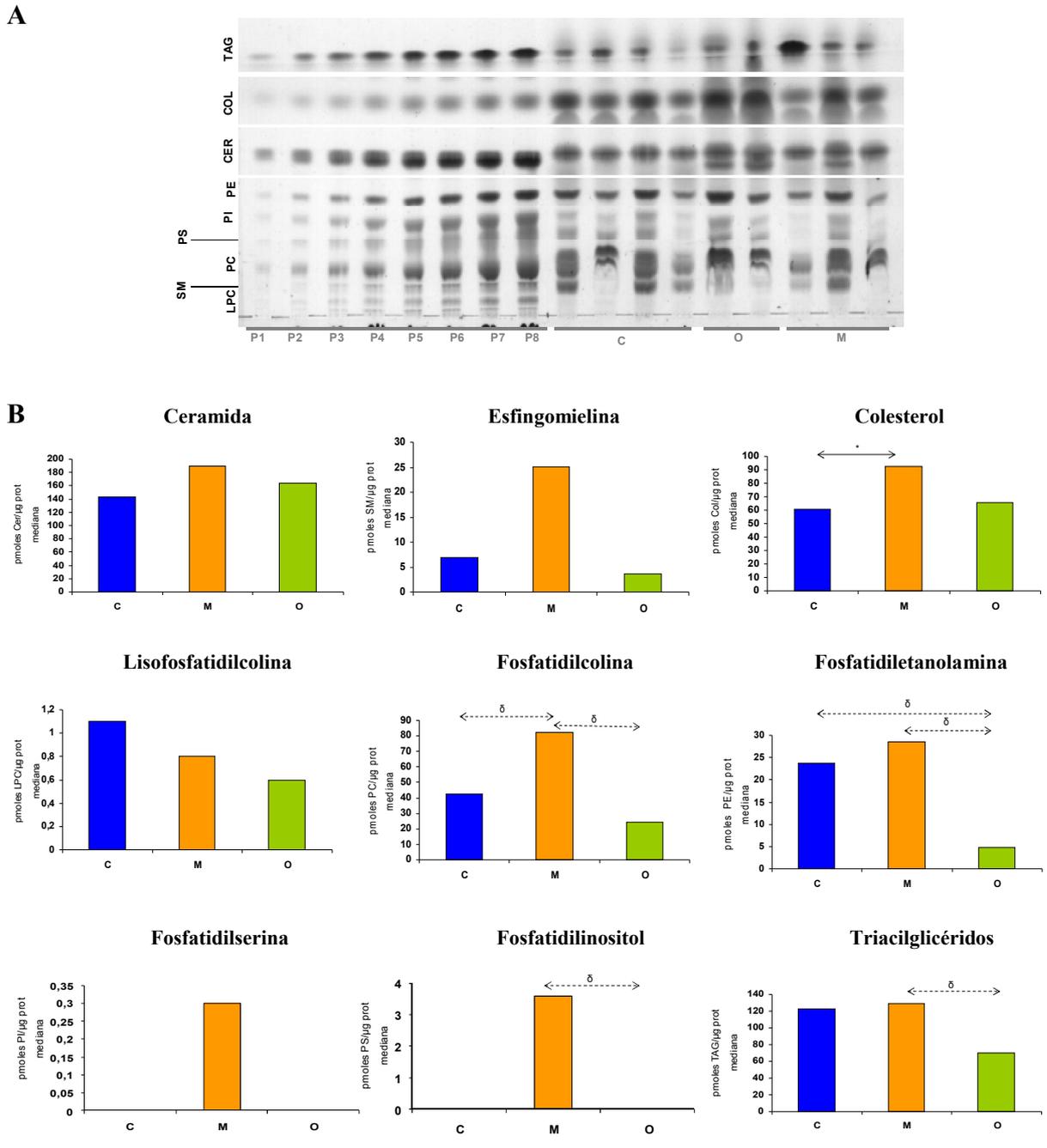


**Figura 33. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales. A:** Imagen representativa de cromatografía en capa fina. **B:** Niveles relativos de lípidos. Cer: ceramida; Col: colesterol; TAG: triacilglicéridos. P1-P8: puntos de la recta patrón; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta$ :  $0.05 > p > 0.1$ ; test no paramétrico U de Mann-Whitney.

### 2.1.3 Lipid Rafts

A diferencia de lo ocurrido en membrana total y membrana soluble, en LR se detectaron todos los tipos de lípidos en estudio (Figura 34 y Tabla 20). El análisis de los niveles relativos de esfingolípidos en los diferentes grupos experimentales mostró un aumento de la abundancia relativa de SM (de aproximadamente 5 veces) en el grupo de aceite de maíz respecto a los otros dos, aunque las diferencias no fueron significativas. En cambio, los niveles de ceramida fueron similares en los tres grupos. Respecto al colesterol, el grupo M presentó niveles significativamente mayores que el grupo C. En relación a los glicerofosfolípidos, tanto LPC como PI no mostraron diferencias significativas entre grupos. En cambio, la abundancia relativa de PC mostró una tendencia al aumento en el grupo M respecto al grupo control y al de aceite de oliva. Además, los niveles de PE tendieron a disminuir en el grupo O respecto a los grupos C y M, mientras que los de PS tendieron a ser

mayores en el grupo de aceite de maíz respecto a los otros dos. Asimismo, los niveles de TAG mostraron una tendencia a la disminución en el grupo de aceite de oliva respecto al grupo de aceite de maíz (Figura 34B).



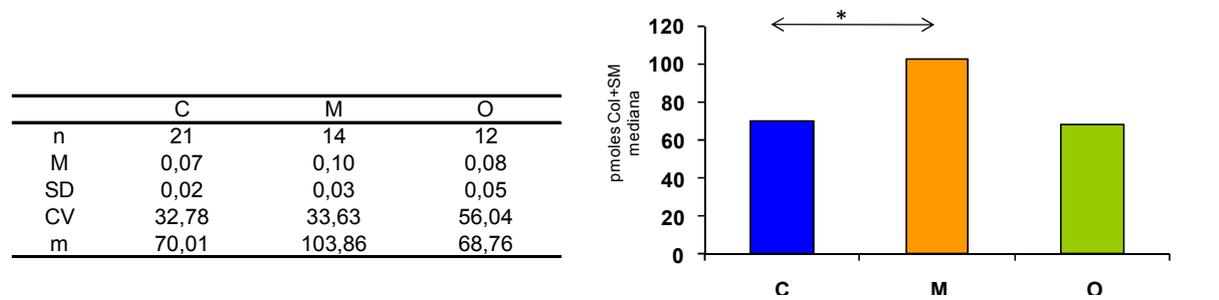
**Figura 34. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de *Lipid Rafts* en adenocarcinomas mamarios experimentales.** A: imagen representativa de cromatografía en capa fina. B: Niveles relativos de lípidos; Cer: ceramida; SM: esfingomiolina; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; P1-P8: puntos de la recta patrón; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta$ :  $0.05 > p > 0.1$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

**Tabla 20. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de *Lipid Rafts* en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

	Esfingolípidos		Esteroles	Glicerofosfolípidos					Lípidos neutros	
	CER	SM	Col	LPC	PC	PE	PS	PI	TAG	
<b>C</b>	n	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	M±SD	141±55,87	20,36±48,5	58,83±86,2	1,782,92	52,65±34,40	21,03±14,79	5,3±7,5	1,62±2,95	131,54±81,65
	CV	39,63	238,23	31,64	163,69	65,33	70,32	140,3	182,36	62,07
	m	142,6	6,89	60,72	1,1	42,34	23,68	0	0	122,48
	perc. 5-95	66,3-221,6	0,3-39,5	32,47-83,94	0-4,2	12,8-126,76	1,20-43,98	0-21,26	0-8,11	69,94-229,7
<b>M</b>	n	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	M±SD	202,36±77,39	34,44±39,32	89,37±26,32	1,992,81	75,25±33,39	42,64±65,65	5,44±6,28	3,54±4,63	137,13±71,89
	CV	38,24	114,14	29,45	140,93	44,37	153,94	115,33	130,54	54,42
	m	189,53	25,07	93,23	0,8	82,28	28,5	3,5	0,3	129,14
	perc. 5-95	106,65-340,22	0,91-103,56	52,62-124,83	0-6,29	18,85-109,96	9,82-127,57	0-16,4	0-12,23	48,62-222,73
<b>O</b>	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	M±SD	245,11±256,10	14,56±24,49	74,77±42,48	4,278,84	48,63±46,77	15,97±20,05	2,66±5,92	2,44±5,39	97,38±46,76
	CV	104,48	168,09	56,81	206,85	96,17	125,7	222,04	220,27	48,02
	m	163,94	3,72	65,45	0,6	24,32	4,7	0	0	69,55
	perc. 5-95	25,17-640,25	1,56-64,41	26,47-133,91	0-17,26	7,59-126,16	0-47,42	0-14,58	0-13,74	61,73-168,35

Cer: ceramida; SM: esfingomielina; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M±SD: media±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%; δ: 0.05>p>0.1; \*: p≤0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En relación a los dos lípidos principales formadores de *Chol-Rafts*, colesterol y esfingomielina, se observó que el contenido total de dichos lípidos era significativamente mayor en el grupo M que en el grupo C, y aunque no se obtuvieron diferencias significativas, el valor de dichos lípidos en el grupo O fue el menor de los tres grupos (Figura 35).

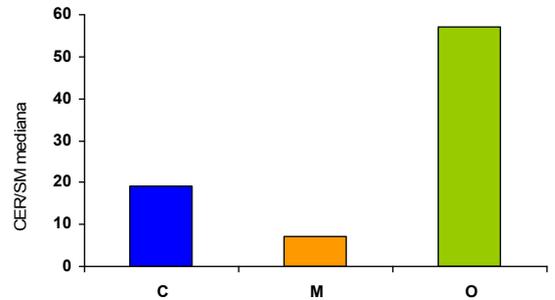


**Figura 35. Efecto de los lípidos de la dieta sobre el contenido en lípidos formadores de *Chol-Rafts*, colesterol y esfingomielina, en adenocarcinomas mamarios experimentales.** C: Grupo C; M: grupo M; O: grupo O. n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana. \*: p≤ 0.05, test no paramétrico U-Mann Witney.

Por otra parte, se determinó la ratio entre los niveles de ceramida y los de esfingomielina, como medida indirecta de la formación de plataformas de ceramida. Los resultados mostraron un aumento de dicha ratio en el grupo de aceite de oliva, siendo la

mediana en este grupo 6 veces mayor que la del grupo M y 3 veces mayor que la del control. Sin embargo, tales diferencias no alcanzaron la significación estadística (Figura 36).

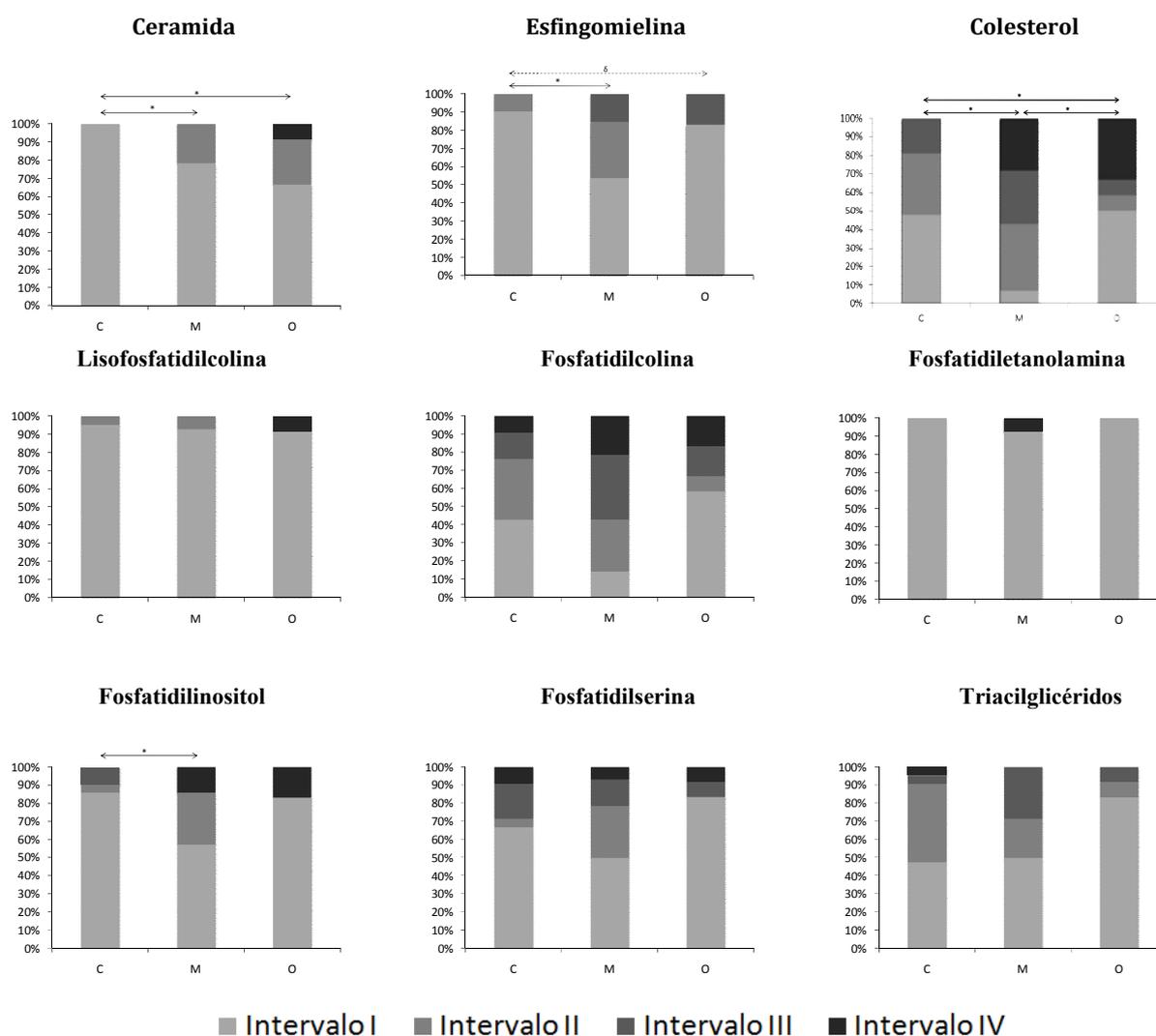
	C	M	O
n	21	13	12
M	64,18	27,81	50,0
SD	117,13	40,75	43,52
CV	182,50	146,53	86,97
m	19	7,11	57



**Figura 36. Efecto de los lípidos de la dieta en la ratio ceramida/esfingomielina de *Lipid Rafts* en adenocarcinomas mamarios experimentales.** C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana; Cer: ceramida; SM: esfingomielina.

Los resultados obtenidos en LR también se analizaron desde el punto de vista cualitativo. Así, se analizó su distribución en 4 clases o intervalos, establecidos a partir de los valores máximo y mínimo obtenidos para cada tipo de lípido (Figura 37). El intervalo I correspondió a los valores más bajos, el intervalo II a los valores medio-bajos, el intervalo III a los valores medio-altos, y el intervalo IV a los valores más altos. Los resultados de dicho análisis cualitativo mostraron que los valores de esfingolípidos (Cer y SM) se distribuían de diferente forma en los distintos grupos experimentales. En cuanto a Cer, todos los adenocarcinomas mamarios del grupo C presentaron valores bajos, a diferencia de los grupos M y O que presentaron un menor porcentaje de muestras tumorales con dichos valores bajos. Asimismo, los valores de SM también fueron mayoritariamente más bajos en el grupo C, mientras que en el grupo M únicamente el 50% de las muestras presentaron valores bajos y el otro 50% valores medios. El grupo O presentó una distribución intermedia entre los 2 grupos.

Resultados



**Figura 37. Distribución en intervalos de los resultados obtenidos en el análisis de la composición de *Lipid Rafts* en adenocarcinomas mamarios experimentales.** C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta: 0.05 > p > 0.1$ , test ji-cuadrado. -véase definición de los intervalos en el texto-

**Tabla 21. Distribución en intervalos de los resultados obtenidos en el análisis de la composición de *Lipid Rafts* en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

		Esfingolípidos				Glicerofosfolípidos				Esteroles											
		Cer		SM		LPC		PC		PE		PI		PS		Col					
	n	Intervalo I	Intervalo II	Intervalo III	Intervalo IV	Intervalo I	Intervalo II	Intervalo III	Intervalo IV	Intervalo I	Intervalo II	Intervalo III	Intervalo IV	Intervalo I	Intervalo II	Intervalo III	Intervalo IV				
C	21	21 (100%)	0	0	0	19 (90,48%)	2 (9,52%)	0	0	21 (100%)	0	0	0	18 (85,74%)	1 (4,77%)	2 (9,52%)	0	7 (33,33%)	4 (19%)	0	21
M	14	11 (78,57%)	3 (21,43%)	0	0	7 (50%)	4 (28,57%)	2 (14,3%)	0	13 (92,86%)	0	0	1 (7,14%)	8 (57,14%)	4 (28,57%)	0	0	5 (34,71%)	4 (28,6%)	4 (28,64%)	14
O	12	8 (66,67%)	3 (25%)	0	1 (8,3%)	10 (83,3%)	0 (16,7%)	0	2	12 (100%)	0	0	0	10 (83,33%)	0	0	2 (16,7%)	1 (8,33%)	1 (8,33%)	4 (33,33%)	12

		Lipidos Neutros			
		TAG		Lipidos Neutros	
	n	Intervalo I	Intervalo II	Intervalo III	Intervalo IV
C	21	10 (47,62%)	9 (42,86%)	1 (4,76%)	1 (4,76%)
M	14	7 (50%)	3 (21,43%)	4 (28,6%)	0
O	12	10 (83,33%)	1 (8,33%)	1 (8,33%)	0

Cer: ceramida; SM: esfingomiélinea; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; PI-P8: puntos de la recta patrón; C: grupo control; M: grupo de aceite de oliva; O: grupo de efectivos -véase definición de los intervalos en el texto-.

## Resultados

La distribución de Col también mostró diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos experimentales, ya que aproximadamente la mitad de las muestras del grupo control mostró valores bajos y el resto se repartió en valores medios. En cambio, el grupo de dieta de aceite de maíz mostró un bajo porcentaje de muestras con valores bajos (7,14%) y el resto de muestras mostraron valores medio-bajos, medio-altos y altos en porcentajes similares. Finalmente, en el grupo de aceite de oliva se observó que el 50% de las muestras presentaban valores bajos de Col respecto al 33% que mostraban valores altos. El único glicerofosfolípido en el que se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de sus valores en los 4 intervalos fue PI, donde el grupo C presentó un alto porcentaje de muestras con valores bajos respecto al grupo M que únicamente mostró valores bajos en el 57,14% de las muestras. El resto de glicerofosfolípidos y TAG no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de sus valores para los 4 intervalos creados entre los diferentes grupos experimentales (Figura 37).

### 2.1.4 Caveolas.

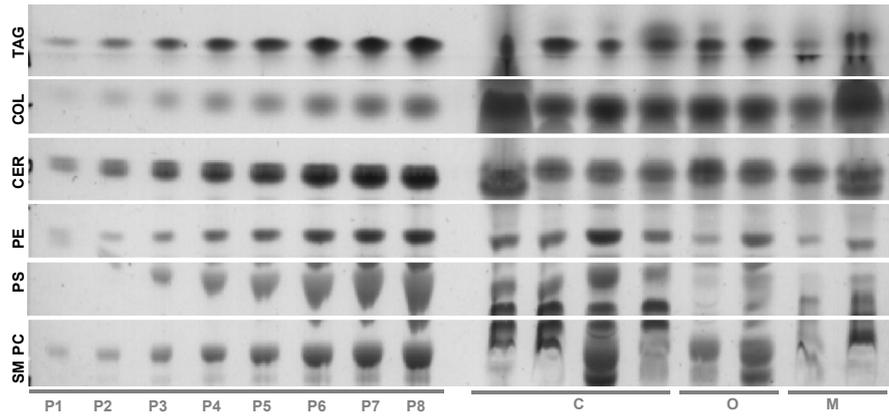
El estudio de caveolas mostró que la mayoría de clases lipídicas no presentaban diferencias significativas por efecto de los lípidos de la dieta. Sin embargo, el colesterol presentó una tendencia a la disminución en el grupo M respecto al grupo control. Por otra parte, la cantidad de PS disminuyó en los grupos de dieta hiperlipídica, de forma significativa en el grupo M (Figura 38 y Tabla 22).

**Tabla 22. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de caveolas en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

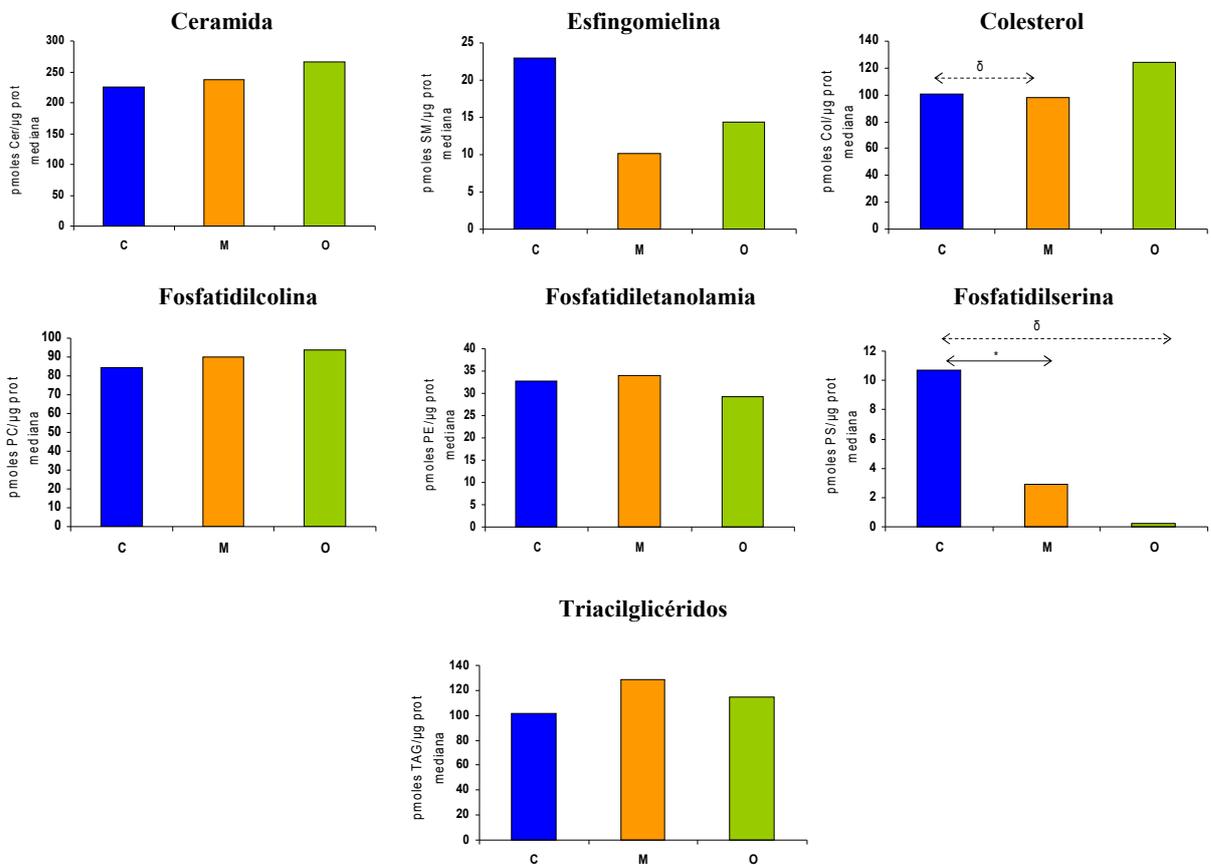
	Esfingolípidos		Esteroles	Glicerofosfolípidos					Lípidos neutros	
	CER	SM	Col	LPC	PC	PE	PS	PI	TAG	
<b>C</b>	n	21	21	21	-	21	21	21	-	21
	M±SD	236,02±37,33	22,14±18,70	103,74±29,12	-	93,59±49,35	38,91±44,72	22,73±37,13	-	166,31±178,51
	CV	15,81	84,46	28,07	-	52,73	114,93	163,36	-	107,33
	m	226,17	22,99	100,43	-	84,13	32,77	10,7	-	101,23
	perc. 5-95	141,39-392,53	0-49,62	63,16-146,78	-	29,31-163,51	1,92-70,75	0-70,79	-	39,21-373,85
<b>M</b>	n	13	13	13	-	13	13	13	-	13
	M±SD	247,85±88,28	19,73±19,86	116,2±32,73	-	78,22±29,37	38,83±36,16	4,86±6,12	-	180,61±168,74
	CV	35,61	100,65	28,17	-	37,54	93,12	125,93	-	93,43
	m	236,87	10,22	98,24	-	89,82	33,88	2,9	-	128,5
	perc. 5-95	133,66-365,23	0-49,75	82,51-162,82	-	34,19-163,51	0-97,66	0-14,78	-	24,76-442,70
<b>O</b>	n	12	12	12	-	12	12	12	-	12
	M±SD	264,30±67,40	21,78±18,04	125,85±29,28	-	87,93±36,58	31,21±13,86	7,08±8,73	-	126,13±92,28
	CV	25,5	82,83	23,26	-	41,6	44,41	123,31	-	73,16
	m	266,86	14,33	124,17	-	93,66	29,3	0	-	114,31
	perc. 5-95	164,22-335,16	0-53,28	90,07-166,08	-	33,09-139,08	15,39-52,66	0-19,57	-	9,76-234,34

Cer: ceramida; SM: esfingomielina; Col: colesterol; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos; C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M±SD: media±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

A



B

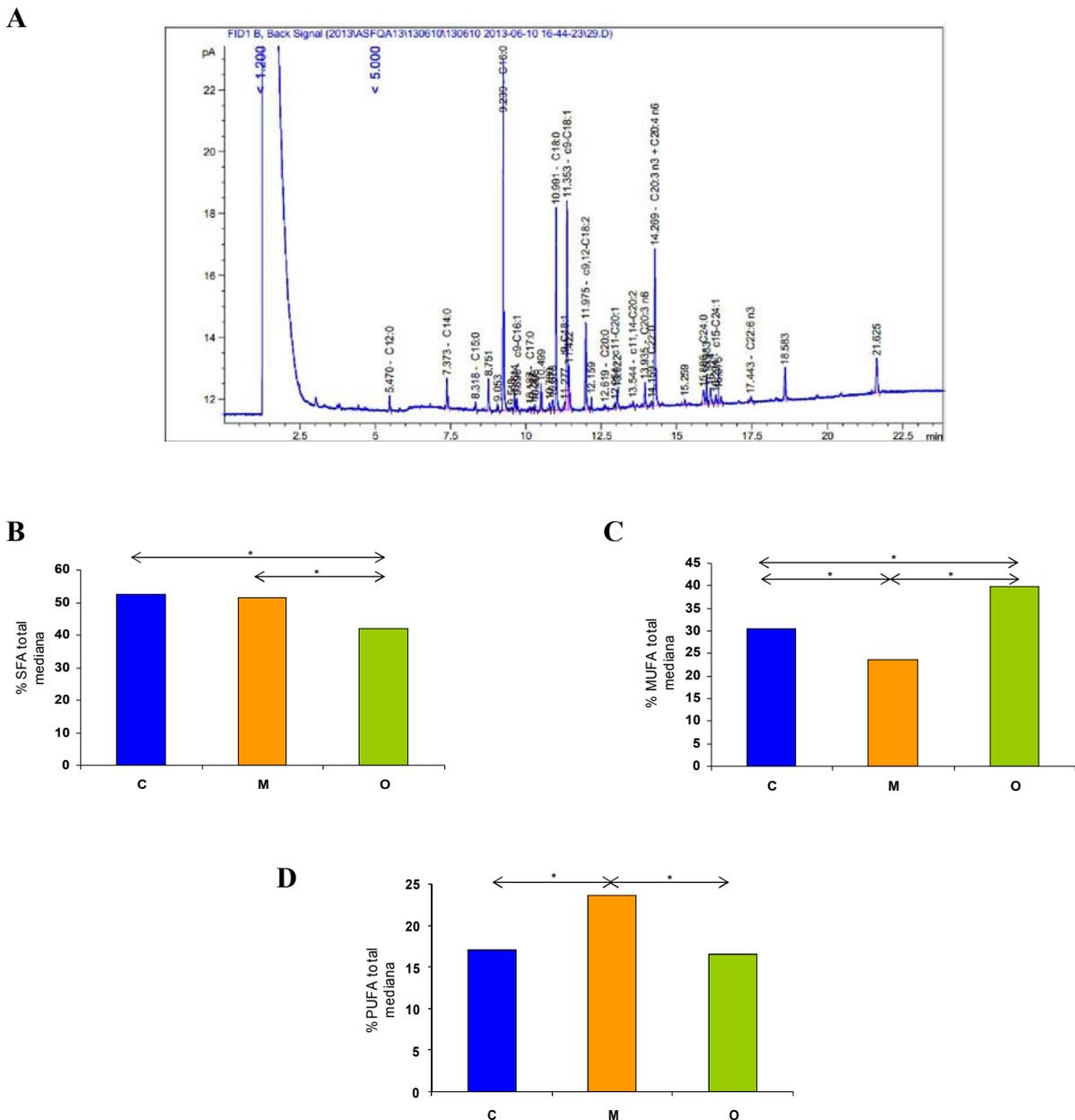


**Figura 38. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición lipídica de caveolas en adenocarcinomas mamarios experimentales.** A: Imagen representativa de cromatografía en capa fina. B: Niveles relativos de lípidos. P1-P8: puntos de la recta patrón; Cer: ceramida; SM: esfingomiolina; Col: colesterol; PC: fosfatidilcolina; PE: fosftatidiletanolamia; PS: fosfatidilserina; TAG: triacilglicéridos. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta: 0.05 > p > 0.1$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

## 2.2 Cambios en la composición en ácidos grasos

### 2.2.1 Membrana total

El análisis de los niveles de ácidos grasos en membrana total mostró que los niveles totales de SFA fueron significativamente menores en el grupo de aceite de oliva en comparación con el grupo control y el de aceite de maíz (Figura 39B).



**Figura 39. Efecto de los lípidos de la dieta sobre el contenido en ácidos grasos de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales. A:** Imagen representativa de un cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases. **B:** Contenido en ácidos grasos saturados (SFA). **C:** Contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). **D:** Contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Resultados

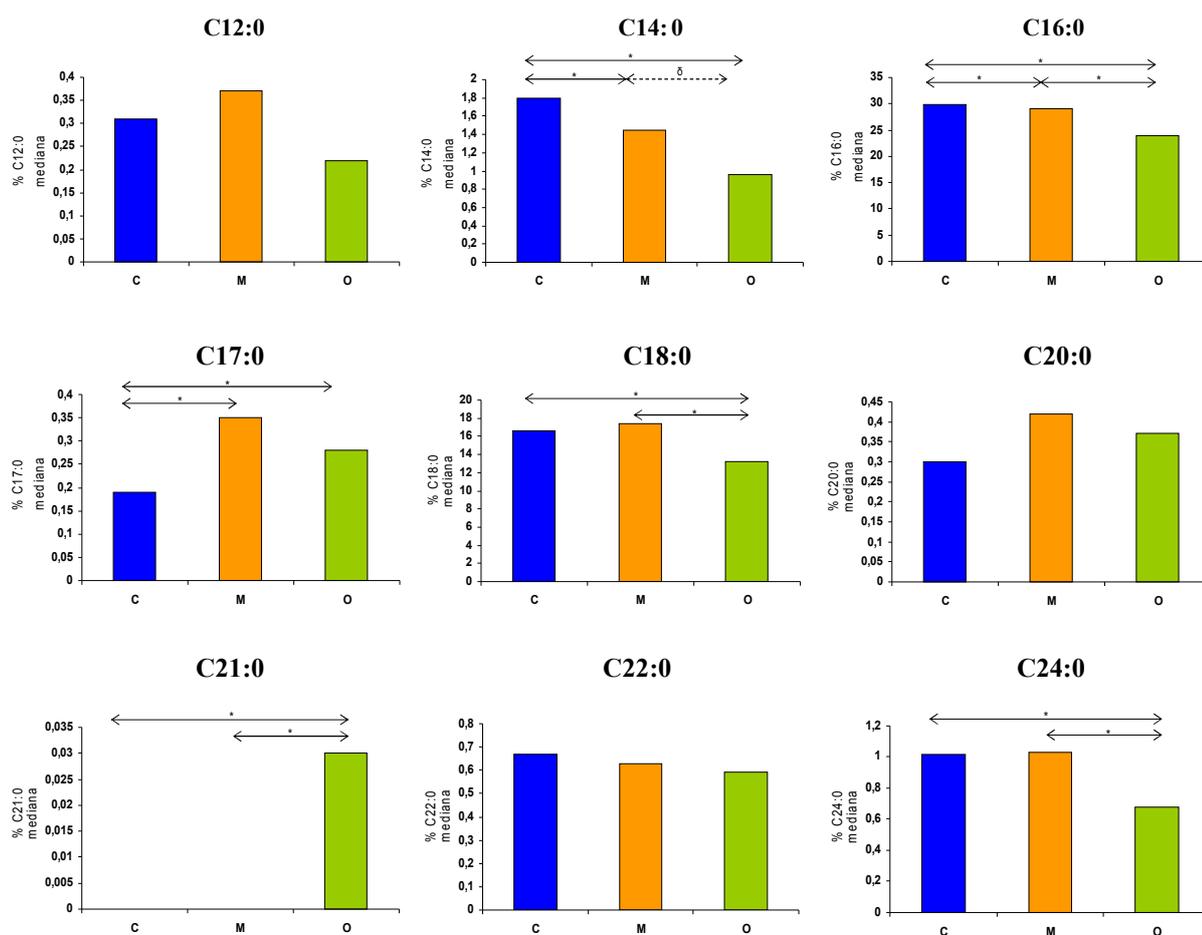
Al estudiar los niveles de cada uno de los ácidos grasos saturados por separado, se observó que los niveles de C14:0 y C16:0 eran significativamente mayores en las membranas de los adenocarcinomas del grupo control que en los de los grupos de aceite de maíz y de aceite de oliva. El contenido de estos dos ácidos grasos fue mayor ó tendió a ser mayor en el grupo M que en el grupo O. En el grupo O también se produjo una disminución de C18:0 y C24:0 en relación a los grupos C y M ( $p \leq 0.05$ ). Asimismo, también se detectaron diferencias significativas en el contenido en C17:0, que presentó valores más altos en los dos grupos de dieta hiperlipídica que en el grupo de dieta normolipídica. Además, el grupo de aceite de oliva fue el único en el que se observaron niveles detectables de C21:0. El resto de SFA, C12:0, C20:0 y C22:0, no mostraron diferencias en sus niveles relativos entre los diferentes grupos experimentales (Figura 40 y tabla 23).

**Tabla 23. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos saturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

Grupo	SFA										
	Laúrico C12:0	Mirístico C14:0	Palmitico C16:0	Margárico C17:0	Esteárico C18:0	Araquídico C20:0	Heneicosálico C21:0	Behénico C22:0	Tricosálico C23:0	Lignocérico C24:0	
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	
C	M±SD	0,63±0,67	1,82±0,54	31,55±2,75	0,15±0,14	15,95±3,34	0,33±0,23	0,01±0,04	0,59±0,20	0,00±0,00	0,940,32
	CV	105,87	29,78	8,71	94,55	20,96	68,92	479,58	33,89	-	34,02
	m	0,31	1,8	29,91	0,19	16,63	0,3	0,00	0,67	0,00	1,02
	Perc.5-95	(0,00-1,8)	(0,81-2,81)	(28,79-34,59)	(0,00-0,36)	(12,15-21,43)	(0,00-0,60)	(0,00-0,00)	(0,38-0,83)	(0,00-0,00)	(0,43-1,29)
	n	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
M	M±SD	0,44±0,29	1,46±0,48	28,99±3,53	0,35±0,14	17,43±3,55	0,38±0,15	0,01±0,03	0,59±0,24	0,00±0,00	1,060,40
	CV	66,38	32,89	12,18	39,32	20,38	40,12	360,56	41,02	-	37,9
	m	0,37	1,45	29,04	0,35	17,4	0,42	0,00	0,63	0,00	1,03
	Perc.5-95	(0,17-0,88)	(0,86-1,20)	(24,52-33,73)	(0,14-0,51)	(11,89-21,70)	(0,13-0,54)	(0,00-0,05)	(0,14-0,87)	(0,00-0,00)	(0,53-1,61)
	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
O	M±SD	10,7±2,16	1,41±1,02	24,09±4,60	0,32±0,07	13,16±3,20	0,66±0,92	0,38±1,34	0,83±0,99	0,00±0,00	0,54±0,29
	CV	200,76	72,26	19,08	22,35	24,29	138,89	270,05	118,93	-	53,04
	m	0,22	0,96	23,96	0,28	13,23	0,37	0,03	0,59	0,00	0,68
	Perc.5-95	(0,13-3,99)	(0,78-2,87)	(19,46-32,56)	(0,25-0,43)	(9,29-17,50)	(0,25-1,90)	(0,00-1,67)	(0,30-2,17)	(0,00-0,00)	(0,21-0,98)

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M±SD: media ±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

## Resultados



**Figura 40.** Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de ácidos grasos saturados en membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta: 0.05 > p > 0.1$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En relación a los MUFA, el grupo de aceite de oliva mostró un mayor contenido de este tipo de ácidos grasos en comparación con los otros dos ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 39C). En cambio, el grupo M fue el que presentó un menor contenido en MUFA.

El análisis individual de los MUFA mostró que el ácido oleico (C18:1n-9) fue significativamente más abundante en el grupo O que en el M y el C, siendo el grupo M el que presentó un menor contenido en este ácido graso ( $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, los niveles de C16:1n-7 disminuyeron significativamente en los dos grupos de dieta hiperlipídica en comparación al grupo control, mientras que los de C18:1n-7 disminuyeron en el grupo M respecto a los grupos C y O ( $p \leq 0.05$ ). No se detectaron diferencias en el contenido de C20:1n-9 entre los distintos grupos experimentales (Figura 41 y Tabla 24).

Tabla 24. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos monoinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.

Grupo	MUFA							
	Palmitoleico C16:1n-7	Margaroleico C17:1n-7	Eláidico C18:1n-9t	Oleico C18:1n-9	Vaccenico C18:1n-7	Eicosaenoico C20:1n-9	Erúxico C22:1n-9	
C	n	23	23	23	23	23	23	
	M±SD	2,68±1,40	0,01±0,04	0,00±0,00	21,33±3,14	5,39±0,92	0,59±0,45	0,04±0,11
	CV	52,15	479,58	479,58	14,7	17,04	74,93	253,53
	m	1,94	0,00	0,00	21,02	5,17	0,55	0,00
M	Perc.5-95	1,09-4,44	(0,00-0,00)	(0,00-0,00)	(16,54-26,87)	(4,27-6,90)	(0,00-1,27)	(0,00-0,35)
	n	13	13	13	13	13	13	
	M±SD	1,00±0,20	0,00±0,00	0,05±0,17	19,47±3,81	3,86±0,79	0,58±0,35	0,06±0,11
	CV	19,98	-	360,56	19,54	20,34	59,72	193,26
O	m	1,05	0,00	0,00	18,17	3,66	0,45	0,00
	Perc.5-95	(0,72-1,29)	(0,00-0,00)	(0,00-0,25)	(16,57-26,61)	(3,01-5,07)	(0,22-1,23)	(0,00-0,28)
	n	12	12	12	12	12	12	
	M±SD	0,95±0,13	0,03±0,05	0,02±0,03	34,16±9,35	4,77±0,49	0,78±0,35	0,050,08
O	CV	13,6	150,76	150,76	27,37	10,33	45,37	157,4
	m	1,01	0,00	0,00	33,57	4,84	0,58	0,04
	Perc.5-95	(0,71-1,06)	(0,00-0,10)	(0,00-0,06)	(22,08-46,41)	(3,92-5,27)	(0,43-1,34)	(0,00-0,17)

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M±SD: media ±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

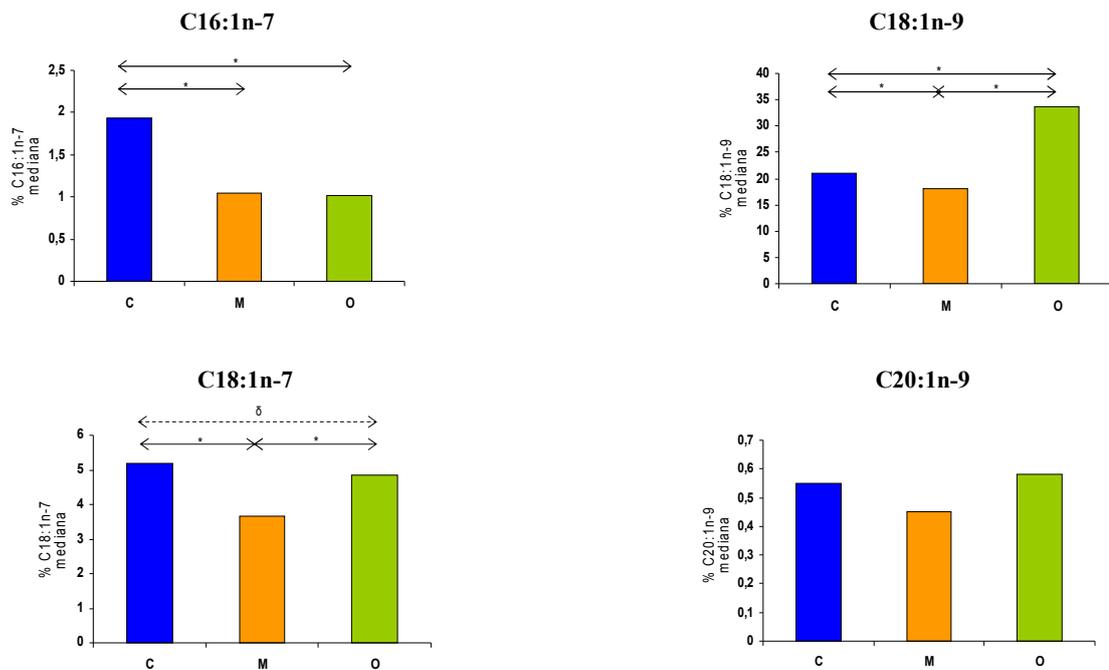


Figura 41. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos monoinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta: 0.05 > p > 0$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Respecto a los PUFA, el grupo M mostró niveles significativamente superiores a los otros dos grupos, mientras que el grupo de aceite de oliva fue el que presentó los niveles más bajo. (Figura 39D). Además, únicamente se detectaron PUFA del tipo n-6 (Figura 39C y Tabla 25).

Resultados

**Tabla 25. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de PUFA n-6 de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

	Total PUFA n6		
	C	M	O
n	23	13	12
M	17,96	24,27	16,76
SD	3,16	3,9	3,63
CV	17,57	16,08	21,68
m	17,08	23,69	16,49

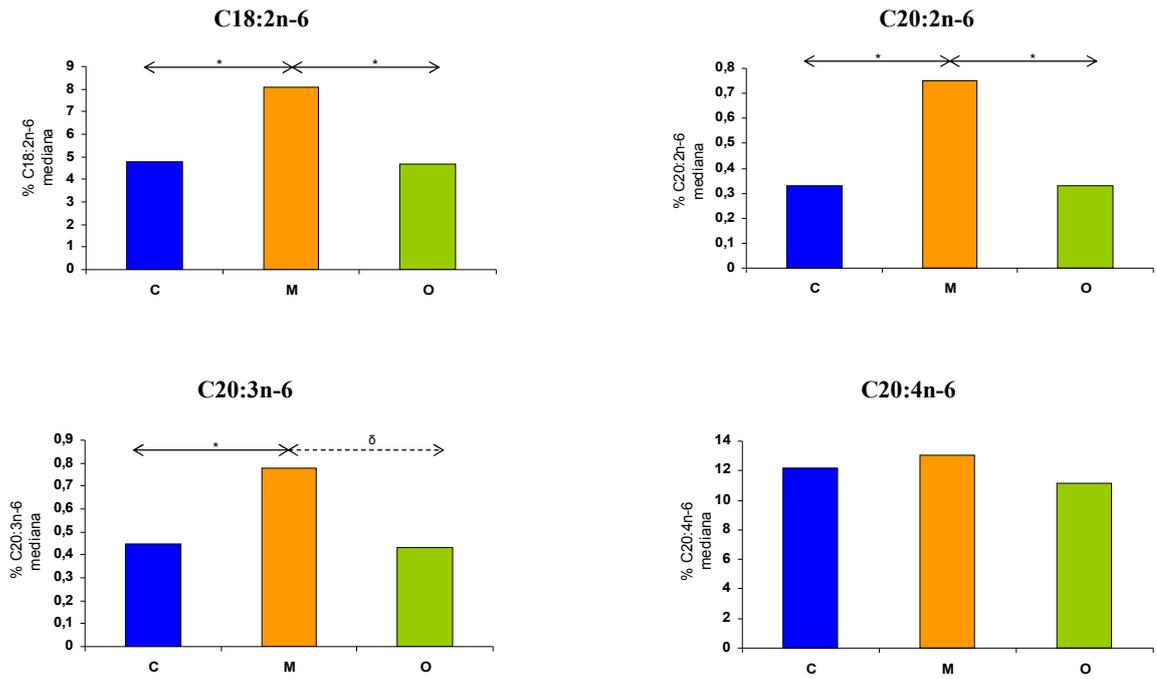
C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M±SD: media±desviación estándar; m: mediana.

El análisis individual de los PUFA mostró que tanto C18:2n-6 como C20:2n-6 presentaron los valores más altos en el grupo M respecto al grupo control y al de aceite de oliva, mientras que C20:3n6 solamente mostró un aumento significativo en el grupo de aceite de maíz frente al grupo C. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas cuando se comparó la abundancia relativa de C20:4n6 entre los diferentes grupos experimentales (Figura 42, Tabla 26).

**Tabla 26. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos poliinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales.**

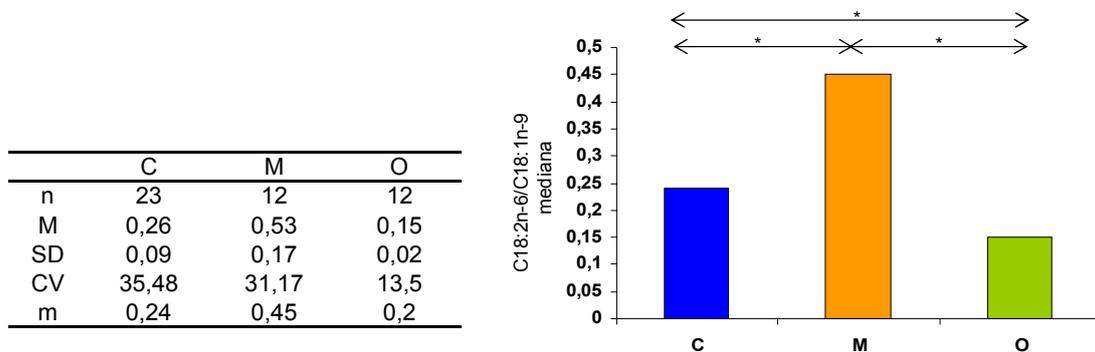
Grupo		PUFA								
		Trans-CLA C18:2n-6t	Linoleico C18:2n-6	γ-Linolénico C18:3 n-6	α-Linolénico C18:3 n-3	Eicosadienoico C20:2n-6	Eicosatrienoico C20:3n-6	Araquidónico C20:4n-6	Eicosapentaenoico C20:5n-3	Behénico C22:2n-6
<b>C</b>	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	M±SD	0,00±0,00	5,58±2,10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,41±0,70	0,38±0,22	11,60±3,44	0,00±0,00	0,00±0,00
	CV	-	37,66	-	-	169,37	57,64	29,68	-	-
	m	0,00	4,77	0,00	0,00	0,33	0,45	12,15	0,00	0,00
	Perc.5-95	(0,00-0,00)	(3,39-10,07)	(0,00-0,00)	(0,00-0,00)	(0,00-0,70)	(0,00-0,68)	(7,00-17,19)	(0,00-0,00)	(0,00-0,00)
<b>M</b>	n	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	M±SD	0,00±0,00	10,72±5,66	0,00±0,00	0,01±0,05	0,80±0,22	0,75±0,49	11,99±3,69	0,00±0,00	0,00±0,00
	CV	-	52,76	-	360,56	27,4	64,78	30,74	-	-
	m	0,00	8,06	0,00	0,00	0,75	0,78	13,09	0,00	0,00
	Perc.5-95	(0,00-0,00)	(6,52-19,99)	(0,00-0,00)	(0,00-0,07)	(0,57-1,22)	(0,16-1,44)	(6,11-15,45)	(0,00-0,00)	(0,00-0,00)
<b>O</b>	n	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	M±SD	0,00±0,00	5,12±1,43	0,02±0,03	0,07±0,12	0,48±0,26	0,44±0,22	10,65±3,56	0,00±0,00	0,00±0,00
	CV	-	27,88	150,76	172,5	53,64	51,15	33,43	-	-
	m	0,00	4,67	0,00	0,00	0,33	0,43	11,12	0,00	0,00
	Perc.5-95	(0,00-0,00)	(2,95-6,84)	(0,00-0,00)	(0,00-0,23)	(0,24-0,86)	(0,15-0,75)	(6,28-15,36)	(0,00-0,00)	(0,00-0,00)

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; n: número de efectivos; M±SD: media±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.



**Figura 42.** Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos poliinsaturados de membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ ;  $\delta: 0.05 > p > 0$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Por último, se determinó la ratio entre los dos ácidos grasos mayoritarios de las dos dietas hiperlipídicas, el ácido linoleico y el ácido oleico. Los resultados indicaron que dicha relación aumentaba significativamente en el grupo de aceite de maíz en comparación a los otros dos grupos experimentales ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 43). En cambio, el grupo O fue el que presentó la menor relación entre ácido linoleico y ácido oleico.

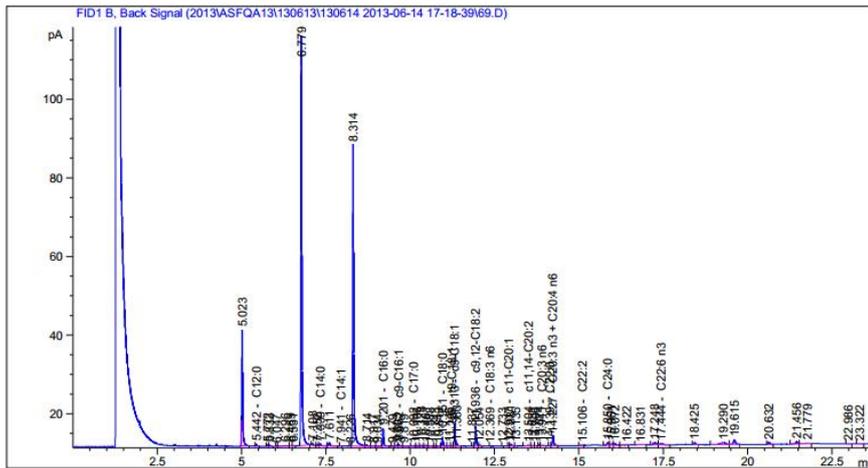


**Figura 43.** Ratio ácido linoleico/ácido oleico en membrana total en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana; \*:  $p \leq 0.05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

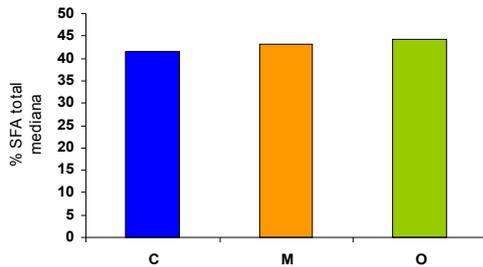
2.2.2 Membrana soluble.

El análisis de los niveles totales de SFA, MUFA y PUFA mostró que el contenido en SFA no se modificaba por efecto de los lípidos de la dieta (figura 44B).

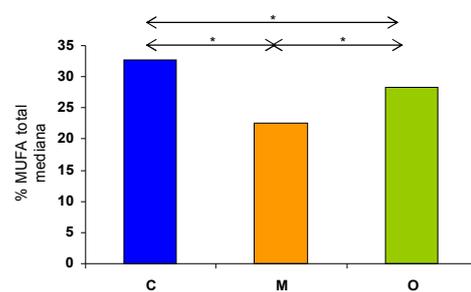
A



B



C



D

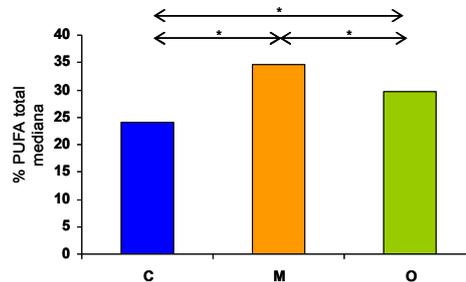


Figura 44. Efecto de los lípidos de la dieta sobre el contenido en ácidos grasos de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales. A: Imagen representativa de un cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases. B: Contenido en ácidos grasos saturados (SFA). C: Contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). D: Contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*:  $p \leq 0.05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney

Resultados

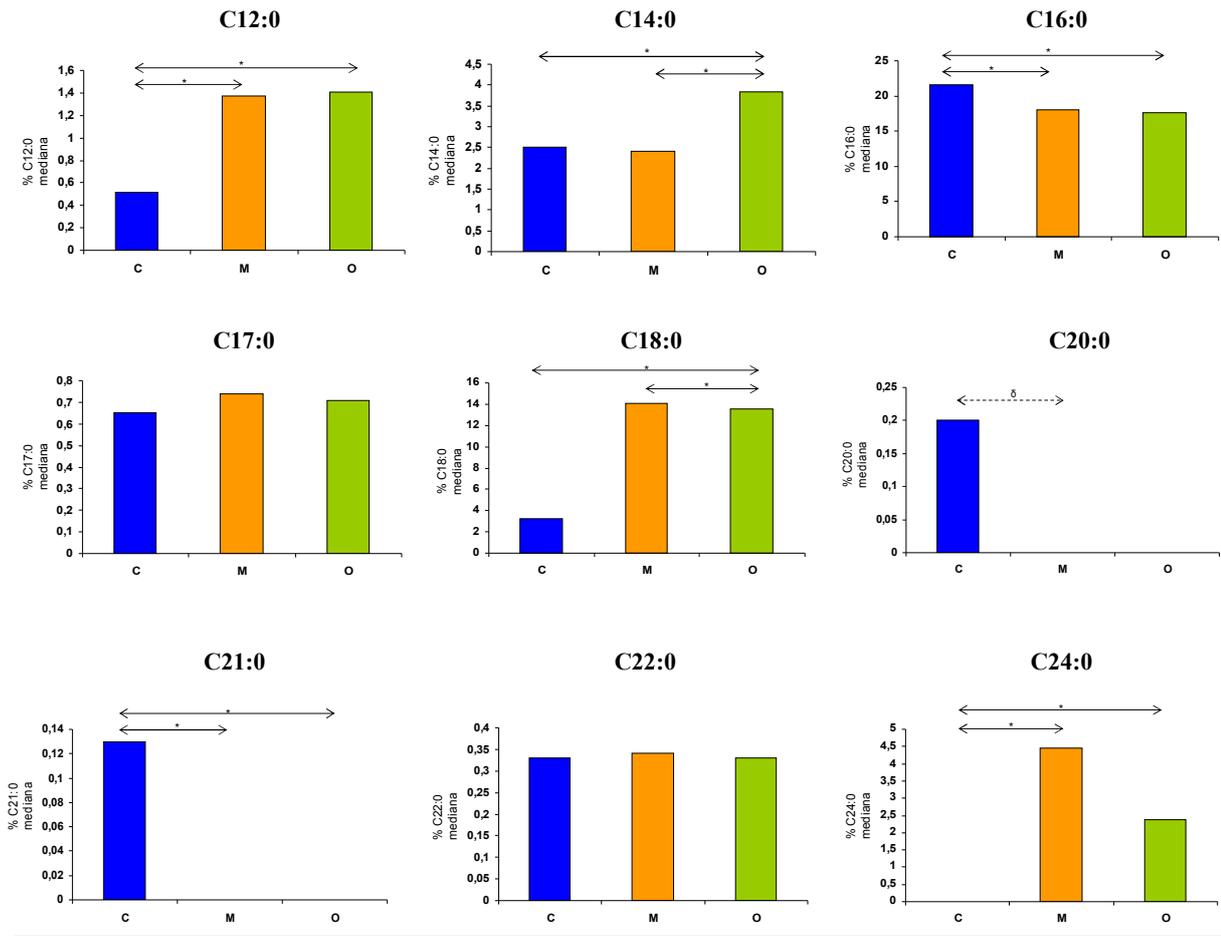
Cuando se estudiaron estos ácidos grasos individualmente se halló un aumento de C12:0 en los grupos de dietas hiperlipídicas respecto al grupo control ( $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, el grupo O mostró unos niveles significativamente mayores de C14:0 respecto al grupo C y al M. En cambio, los niveles de C16:0 fueron mayores en el grupo control que en los dos grupos de dieta hiperlipídica ( $p \leq 0.05$ ). Los ácidos grasos C20:0 y C21:0 solamente se detectaron en el grupo de dieta normolipídica, al contrario de lo sucedido con el C24:0 que sólo se detectó en los grupos M y O. Por otra parte, el grupo de aceite de maíz mostró mayores niveles de C18:0 que el grupo de aceite de oliva, el cual, a su vez, presentó una mayor abundancia de dicho ácido graso que el grupo control ( $p \leq 0.05$ ). Por último, los niveles de C17:0 y C22:0 fueron similares en los tres grupos experimentales (Figura 45 y Tabla 27).

**Tabla 27. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos los diferentes ácidos grasos saturados de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales.**

Grupo		SFA									
		Laúrico C12:0	Mirístico C14:0	Palmitico C16:0	Margárico C17:0	Esteárico C18:0	Araquídico C20:0	Heneicosilico C21:0	Behénico C22:0	Tricosilico C23:0	Lignocérico C24:0
C	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	M±SD	0,66±1,54	2,60±0,90	22,68±3,20	0,54±0,35	13,58±0,03	0,22±0,28	0,26±0,31	0,39±0,30	0,00±0,00	0,09±0,12
	CV	81,63	34,63	14,11	65,07	24,07	127,18	21,26	75,01	-	126,05
	m	0,52	2,51	21,57	0,65	3,27	0,2	0,13	0,33	0,00	0,00
	Perc.5-95	(0,22-2,08)	(1,01-3,55)	(18,66-29,01)	(0,00-0,97)	(8,69-18,10)	(0,00-0,64)	(0,00-0,35)	(0,00-1,02)	(0,00-0,00)	(0,00-0,28)
M	n	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
	M±SD	1,30±0,60	2,51±0,67	18,07±1,51	0,76±0,24	13,96±2,67	0,06±0,11	0,05±0,13	0,29±0,18	0,00±0,00	5,07±4,06
	CV	46,3	26,53	8,35	31,67	19,1	172,71	254,2	62,9	-	80,02
	m	1,37	2,4	18,02	0,74	14,04	0,00	0,00	0,34	0,00	4,46
	Perc.5-95	(0,17-1,96)	(1,73-3,60)	15,94-20,36)	(0,41-1,17)	(9,04-17,95)	(0,00-0,28)	(0,00-0,35)	(0,00-0,51)	(0,00-0,00)	(0,00-11,71)
O	n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	M±SD	1,99±1,11	3,63±1,02	18,53±2,26	0,68±0,39	14,46±1,32	0,07±0,16	0,03±0,09	0,27±0,18	0,00±0,00	3,60±2,81
	CV	55,86	28,08	12,17	57,49	9,11	225,47	331,66	66,71	-	78,19
	m	1,41	3,83	17,56	0,71	13,55	0,00	0,00	0,33	0,00	2,39
	Perc.5-95	(1,02-3,72)	(2,15-5,20)	(15,79-21,67)	(0,00-1,14)	(13,13-16,34)	(0,00-0,40)	(0,00-0,15)	(0,00-0,45)	(0,00-0,00)	(0,00-7,84)

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M±SD: media ±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

## Resultados



**Figura 45. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos saturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva.**

En relación a los MUFA, el grupo M fue el que presentó el menor contenido en estos ácidos grasos, mientras el grupo O mostró valores intermedios entre el grupo M y el control ( $p \leq 0.05$ ) (figura 44C).

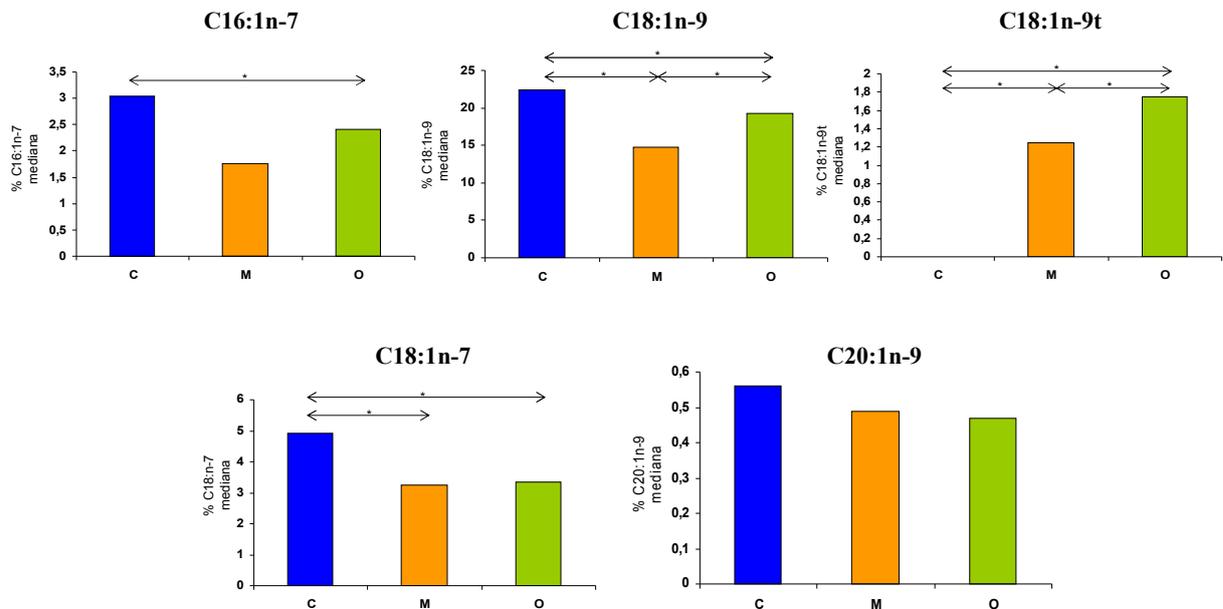
El análisis individual de los diferentes MUFA mostró que el contenido en C16:1n-7 era mayor en el grupo C que en el grupo O. Asimismo, el C18:1n-7 presentó niveles superiores en el grupo de dieta normolipídica en comparación a los dos grupos de dieta hiperlipídica. De igual forma, el contenido de C18:1n-9 fue mayor en el grupo control que en los grupos M y O, y a su vez este último presentó valores de dicho ácido graso mayores que el grupo de aceite de maíz. En cambio, los grupos de dieta hiperlipídica mostraron niveles mayores de C18:1n-9t que el grupo control, siendo el grupo O el que presentó niveles más

altos de dicho ácido graso. No se observaron diferencias significativas en los niveles de C20:1n-9 por efecto de los lípidos de la dieta (Figura 46 y Tabla 28).

**Tabla 28. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos monoinsaturados de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales.**

Grupo		MUFA						
		Palmitoleico C16:1n-7	Margaroleico C17:1n-7	Elaídico C18:1n-9t	Oleico C18:1n-9	Vaccenico C18:1n-7	Eicosaenoico C20:1n-9	Erúcido C22:1n-9
<b>C</b>	n	23	23	23	23	23	23	23
	M±SD	3,54±1,56	0,01±0,03	0,02±0,07	25,57±8,57	5,13±0,79	0,57±0,45	0,05±0,1
	CV	44,04	458,26	458,26	33,51	15,49	78,52	182,49
	m	3,04	0,00	0,00	22,47	4,93	0,56	0,00
	Perc.5-95	(1,90-5,52)	(0,00-0,00)	(0,00-0,00)	(15,45-41,52)	(3,82-6,17)	(0,00-1,40)	(0,00-0,20)
<b>M</b>	n	14	14	14	14	14	14	14
	M±SD	1,94±0,60	0,04±0,10	1,19±0,60	16,20±3,44	3,39±0,60	0,55±0,42	0,08±0,12
	CV	31,09	254,2	50,85	21,26	17,65	76,59	151,55
	m	1,76	0,00	1,25	14,77	3,26	0,49	0,00
	Perc.5-95	(1,24-2,87)	(0,00-0,28)	(0,05-1,95)	(13,38-22,60)	(2,76-4,29)	(0,00-1,40)	(0,00-0,20)
<b>O</b>	n	11	11	11	11	11	11	11
	M±SD	2,20±0,56	0,00±0,00	1,90±0,86	18,98±3,11	3,19±0,69	0,63±0,50	0,08±0,14
	CV	25,54	-	45,25	16,39	21,59	80,4	173,04
	m	2,41	0,00	1,75	19,21	3,34	0,47	0,00
	Perc.5-95	(1,44-2,87)	(0,00-0,00)	(1,00-3,53)	(14,51-22,56)	(2,12-4,15)	(0,00-1,44)	(0,00-0,32)

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M±SD: media ±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.



**Figura 46. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos monoinsaturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. \*: p<0.05, test no paramétrico U de Mann-Whitney.**

En cuanto a los PUFA, el grupo de aceite de maíz fue el que mostró los mayores niveles de estos ácidos grasos, seguido del grupo de aceite de oliva y finalmente del control (Figura 44D). Dentro de los PUFA, igual que en membrana total, en MS sólo se detectaron PUFA de la familia n-6. El grupo M fue el que mayores niveles de dichos ácidos grasos mostró respecto al grupo control y al grupo O ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 29).

**Tabla 29. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en PUFA n-6 de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales.**

	Total PUFA n6		
	C	M	O
n	21	14	11
M	23,63	34,47	29,21
SD	5,15	3,14	2,35
CV	21,8	9,11	8,05
m	23,13	34,74	30,94

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M $\pm$ SD: media $\pm$ desviación estándar; m: mediana.

El análisis individual de los PUFA mostró que la mayoría de ellos presentaba niveles más altos en el grupo de aceite de maíz que en los otros grupos. El C18:2n-6 mostró los valores significativamente más bajos en el grupo O, mientras que los niveles de C20:2n-6 fueron similares en los grupos C y O ( $p \leq 0.05$ ). Asimismo, el contenido en C20:3n-6 fue mayor en el grupo de aceite de maíz que en el grupo C. Por último, los dos grupos de dieta hiperlipídica presentaron un aumento de C20:4n-6 respecto al grupo control (Figura 47 y Tabla 30).

De igual forma que para membrana total, se determinó la relación entre ácido linoleico y ácido oleico. Los resultados indicaron que dicha relación aumentaba por efecto de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz y disminuía por la dieta de aceite de oliva, en ambos casos de forma significativa (Figura 48).

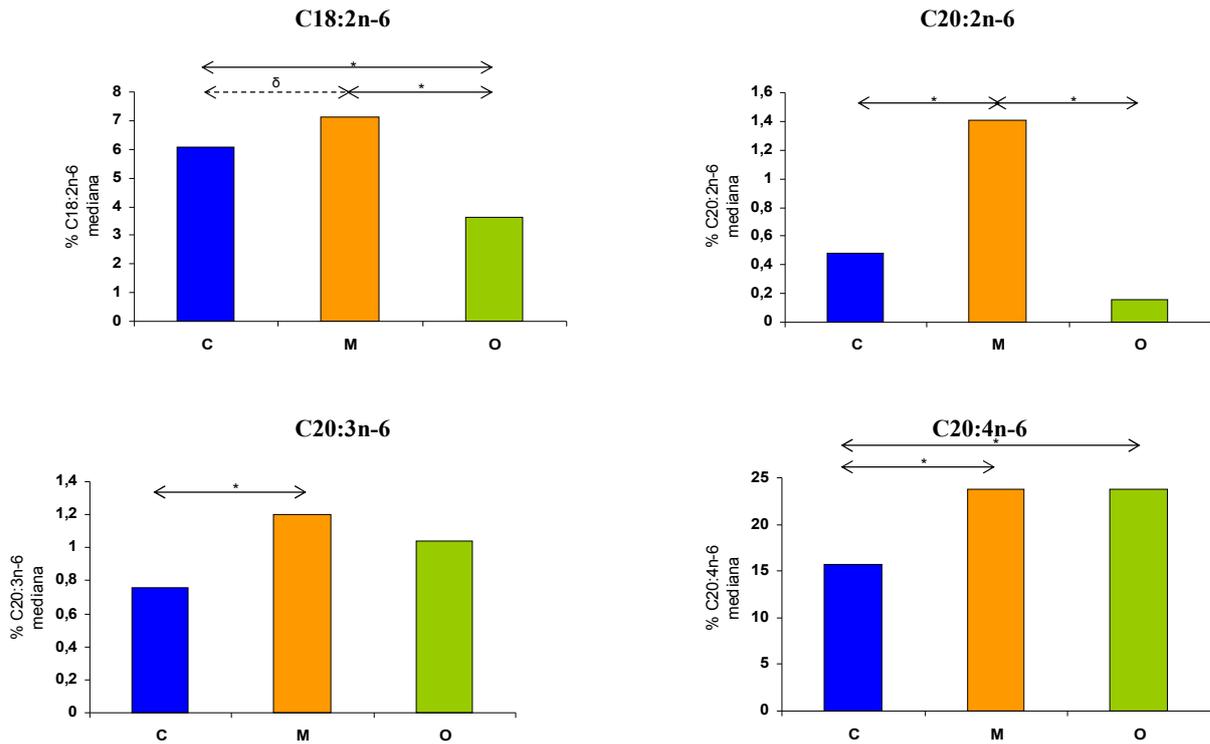


Figura 47. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en ácidos grasos poliinsaturados de membrana soluble en adenocarcinomas mamarios experimentales. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva;  $\delta: 0.05 > p > 0.1$ ; \*:  $p \leq 0.05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

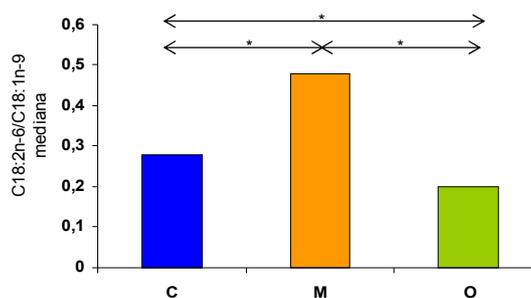
Tabla 30. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición en los diferentes ácidos grasos poliinsaturados de membrana soluble de adenocarcinomas mamarios experimentales.

Grupo	PUFA								
	Trans-CLA C18:2n-6t	Linoleico C18:2n-6	$\gamma$ -Linolénico C18:3 n-6	$\alpha$ -Linolénico C18:3 n-3	Eicosadienoico C20:2n-6	Eicosatrienoico C20:3n-6	Araquidónico C20:4n-6	Eicosapentaenoico C20:5n-3	Behénico C22:2n-6
<b>C</b>	n 23 M±SD 0,00±0,00 CV - m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,00)	n 23 M±SD 6,56±1,79 CV 27,2 m 6,06 Perc.5-95 (4,49-10,74)	n 23 M±SD 0,00±0,01 CV 458,26 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,00)	n 23 M±SD 0,04±0,10 CV 251,1 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,29)	n 23 M±SD 0,74±0,98 CV 131,4 m 0,48 Perc.5-95 (0,80-2,17)	n 23 M±SD 0,85±0,58 CV 68,2 m 0,76 Perc.5-95 (0,00-2,14)	n 23 M±SD 15,47±5,50 CV 35,56 m 15,73 Perc.5-95 (7,12-23,17)	n 23 M±SD 0,03±0,07 CV 200,69 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,15)	n 23 M±SD 0,39±0,69 CV 178,22 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-1,14)
<b>M</b>	n 14 M±SD 0,00±0,00 CV - m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,00)	n 14 M±SD 9,71±6,51 CV 67,02 m 7,13 Perc.5-95 (5,53-23,14)	n 14 M±SD 0,02±0,05 CV 256,45 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,12)	n 14 M±SD 0,02±0,07 CV 374,17 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,09)	n 14 M±SD 1,43±0,47 CV 33,17 m 1,41 Perc.5-95 (0,80-2,17)	n 14 M±SD 1,20±0,36 CV 29,83 m 1,2 Perc.5-95 (0,76-1,80)	n 14 M±SD 21,97±5,46 CV 24,87 m 23,71 Perc.5-95 (7,12-23,17)	n 14 M±SD 0,06±0,11 CV 180,23 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,15)	n 14 M±SD 0,13±0,17 CV 126,92 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-1,14)
<b>O</b>	n 11 M±SD 0,01±0,02 CV 331,66 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,04)	n 11 M±SD 3,63±0,64 CV 17,6 m 3,64 Perc.5-95 (2,80-4,41)	n 11 M±SD 0,02±0,08 CV 331,66 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,14)	n 11 M±SD 0,00±0,00 CV - m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,00)	n 11 M±SD 0,46±0,59 CV 130,67 m 0,16 Perc.5-95 (0,00-1,46)	n 11 M±SD 0,94±0,50 CV 53,33 m 1,04 Perc.5-95 (0,00-1,47)	n 11 M±SD 24,16±2,64 CV 10,94 m 23,77 Perc.5-95 (20,10-27,65)	n 11 M±SD 0,06±0,10 CV 171,41 m 0,00 Perc.5-95 (0,00-0,21)	n 11 M±SD 0,48±0,46 CV 96,31 m 0,56 Perc.5-95 (0,00-1,23)

C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva. n: número de efectivos; M±SD: media ±desviación estándar; m: mediana; perc 5-95: percentil 5%-95%.

## Resultados

	C	M	O
n	21	14	11
M	0,28	0,57	0,19
SD	0,08	0,23	0,02
CV	31,04	40,85	8,7
m	0,28	0,48	0,19



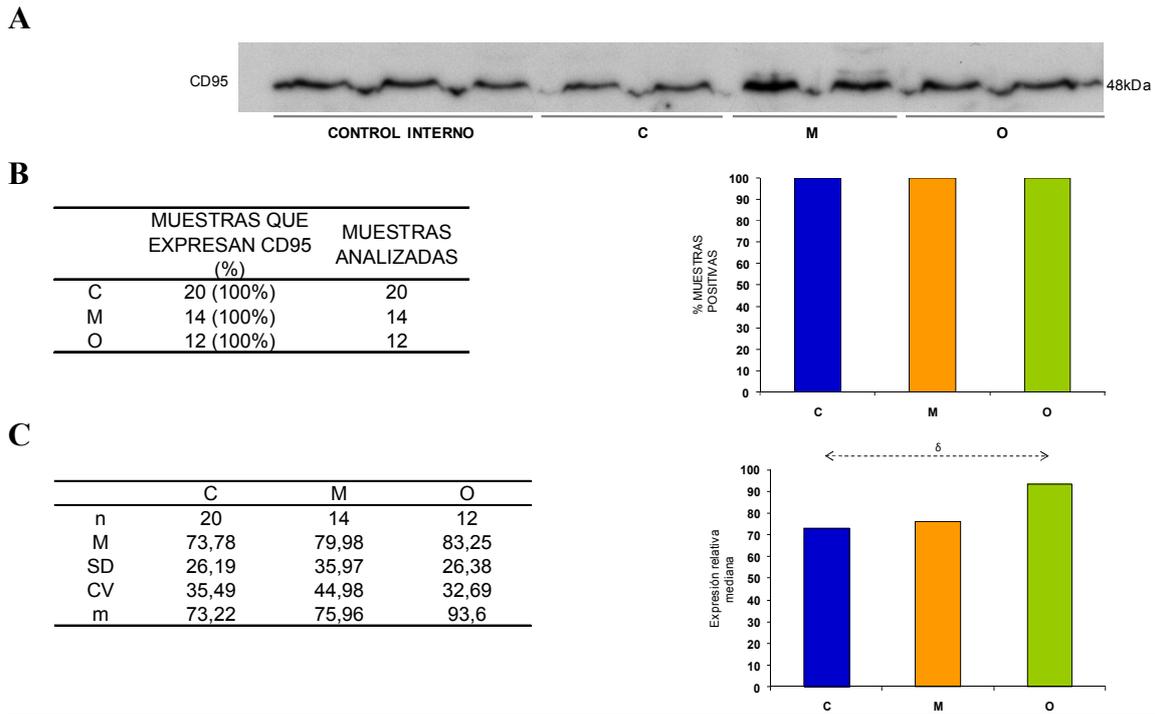
**Figura 48. Ratio ácido linoleico/ácido oleico en membrana soluble de adenocarcinomas mamarios en los diferentes grupos experimentales.** C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana. \*:  $p \leq 0.05$ , test no paramétrico U de Mann-Whitney.

### 2.3 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA CD95

A partir de los resultados previos obtenidos por el grupo investigador (REF) en los que se halló un aumento de la apoptosis en el grupo alimentado con aceite de oliva, así como de los resultados del presente estudio en los que la formación de plataformas de Cer se vería aumentada este grupo, se planteó la necesidad de analizar los niveles de receptores de muerte presentes en la membrana. De este modo, y según los estudios realizados por varios autores, se determinó que uno de los receptores más importantes en la vía extrínseca de la apoptosis que estaba relacionado con los *Cer-Rafts* era CD95 (APO-1/Fas) (REF).

El análisis de los niveles de CD95 únicamente pudo realizarse en membrana total debido a problemas metodológicos y de disponibilidad de muestras en el caso de LR y caveolas. Los resultados mostraron que la totalidad de adenocarcinomas mamarios experimentales estudiados expresaban dicho receptor en membrana (Figura 49B).

Por otro lado, en el estudio cuantitativo de los niveles relativos de CD95 se observó un aumento, próximo a la significación estadística, en el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva respecto al grupo control (Figura 49C).



**Figura 49. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión de CD95 en membrana total de adenocarcinomas mamarios experimentales. A:** Imagen representativa de Western Blot. **B:** Porcentaje de muestras positivas para CD95. **C:** Expresión relativa de CD95. C: grupo control; M: grupo de aceite de maíz; O: grupo de aceite de oliva; n: número de efectivos; M: media; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación (%); m: mediana.  $\delta$ :  $0.05 < p < 0.1$ , test no paramétrico U-Mann Whitney.

### 3. ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

Una vez estudiados los efectos de los lípidos de la dieta sobre la composición en proteínas, lípidos y ácidos grasos de la membrana de los adenocarcinomas mamarios, se analizó la posible correlación entre diferentes tipos de parámetros con el fin de integrar los resultados y profundizar en su significado -véanse gráficas de dichas correlaciones en el Anexo-.

#### 3.1. Niveles de los principales lípidos formadores de *Chol-Rafts* (Col y SM) y Cav1

Se analizó si los niveles de Col así como de Col y SM juntos en LR se correlacionaban con los niveles de Cav1. Los resultados mostraron una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de Col y Cav1 en LR (Tabla 31A) del grupo O. Asimismo, en este grupo los niveles de Col y SM juntos en LR también se correlacionaron positivamente ( $p=0.05$ ) con los niveles de Cav1 (Tabla 31B).

Tabla 31. Correlación entre los niveles de Col (A) o Col y SM (B) y los niveles de Cav1.

A					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	-0,025	NDS	-0,041	NDS
<b>M</b>	14	-0,089	NDS	-0,026	NDS
<b>O</b>	12	0,519	NDS	0,616	0,05

B					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,085	NDS	0,094	NDS
<b>M</b>	14	-0,089	NDS	-0,07	NDS
<b>O</b>	12	0,577	0,05	0,676	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.2. Niveles de los principales lípidos formadores de *Chol-Rafts* (Col y SM) y del principal lípido formador de *Cer-Rafts* (Cer)

También se analizó la posible correlación entre el contenido de Col o Col y SM y los niveles de Cer en LR. En todos los grupos se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa (Tabla 32).

Tabla 32. Correlación entre los niveles de Col (A) o Col y SM (B) y los niveles de Cer.

A					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,43	0,01	0,664	0,01
<b>M</b>	14	0,467	0,05	0,634	0,05
<b>O</b>	12	0,639	0,01	0,771	0,01

B					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,333	0,05	0,602	0,01
<b>M</b>	14	0,422	0,05	0,568	0,05
<b>O</b>	12	0,732	0,01	0,856	0,01

### 3.3 Niveles de ácidos grasos y lípidos y proteínas formadores de microdominios de membrana

#### 3.3.1. Niveles de SFA en membrana total y lípidos formadores de *Chol-Rafts*

En el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva se observó que los niveles de SFA se correlacionaban positivamente con los de Col (Tabla 33A), mientras que en el resto de

grupos no se halló correlación alguna. Por otro lado, no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre el análisis de los niveles de SFA y el contenido total de los dos lípidos principales de este tipo de dominios, Col y SM (Tabla 33B).

**Tabla 33. Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y Col (A) o Col y SM (B).**

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,082	NDS	0,178	NDS
<b>M</b>	13	-0,106	NDS	-0,116	NDS
<b>O</b>	12	0,439	NDS	0,635	0,05

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,179	NDS	0,28	NDS
<b>M</b>	13	-0,079	NDS	-0,114	NDS
<b>O</b>	12	0,355	NDS	0,566	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.3.2 Niveles de SFA en membrana total y Cav1.

En el grupo O los niveles de SFA en membrana total también se correlacionaron positivamente con la expresión de Cav1. Dicha correlación no se halló en los grupos C y M (Tabla 34).

**Tabla 34. Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y Cav1.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,145	NDS	0,176	NDS
<b>M</b>	13	0,079	NDS	0,055	NDS
<b>O</b>	12	0,618	0,05	0,735	0,01

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.3.3. Niveles de MUFA en membrana total y principales lípidos formadores de Chol-Rafts

Los niveles de MUFA y los de lípidos formadores de Chol-Rafts (Col ó Col y SM juntos) se correlacionaron negativamente en el grupo O, mientras que en los otros 2 grupos no se halló dicha correlación (Tabla 35A,B).

Tabla 35. Correlación entre los niveles de MUFA en membrana total y Col (A) o Col y SM (B).

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	-0,188	NDS	-0,249	NDS
<b>M</b>	13	0,273	NDS	0,256	NDS
<b>O</b>	12	-0,439	NDS	-0,681	0,05

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	-0,304	NDS	-0,433	NDS
<b>M</b>	13	0,091	NDS	0,102	NDS
<b>O</b>	12	-0,419	NDS	-0,63	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.3.4. Niveles de MUFA en membrana total y Cav1

En el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva los niveles de expresión de Cav1 se correlacionaron negativamente con los de MUFA de forma significativa. En cambio, dicha relación no se encontró en los otros dos grupos experimentales (Tabla 36).

Tabla 36. Correlación entre los niveles de MUFA en membrana total y Cav1.

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	-0,065	NDS	0,066	NDS
<b>M</b>	13	-0,117	NDS	-0,091	NDS
<b>O</b>	12	-0,618	0,05	-0,789	0,01

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.3.5 Niveles de PUFA en membrana total y lípidos formadores de Chol-Rafts

No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre los niveles de PUFA en membrana total y los niveles de lípidos formadores de Chol-Rafts (Col y SM) en LR (Tabla 37A,B).

**Tabla 37. Correlación entre los niveles de PUFA en membrana total y Col (A) o Col y SM (B).**

A	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,121	NDS	0,122	NDS
<b>M</b>	13	-0,221	NDS	-0,256	NDS
<b>O</b>	12	0,114	NDS	0,225	NDS

B	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,198	NDS	0,29	NDS
<b>M</b>	13	-0,247	NDS	-0,146	NDS
<b>O</b>	12	0,097	NDS	0,21	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.3.6 Niveles de PUFA en membrana total y Cav1

Del mismo modo que en el caso anterior, no se encontró correlación estadísticamente significativa entre los niveles de PUFA en membrana total y los de Cav1 en ninguno de los 3 grupos experimentales (Tabla 38).

**Tabla 38. Correlación entre los niveles de PUFA en membrana total y Cav1.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	21	0,035	NDS	0,014	NDS
<b>M</b>	13	0,117	NDS	0,185	NDS
<b>O</b>	12	0,206	NDS	0,243	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

## 3.4 Niveles de la proteína pro-apoptótica CD95, ceramida y ácidos grasos

### 3.4.1 Niveles de CD95 en membrana total y ceramida en LR

Se analizó si los niveles del receptor proapoptótico CD95 en membrana total correlacionaban con los niveles del principal lípido formador de *Cer-Rafts* (Cer) en LR. Los resultados no mostraron ninguna correlación estadísticamente significativa entre dichos parámetros (Tabla 39A). Tampoco se correlacionaron los niveles de dicho receptor de membrana con la relación Cer/SM en LR, indicador de la formación de plataformas de ceramida (Tabla 39B).

**Tabla 39. Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y los niveles de Cer (A) y Cer/SM (B).**

A	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
C	20	0,07	NDS	0,189	NDS
M	14	0,089	NDS	0,172	NDS
O	12	-0,374	NDS	-0,517	NDS

B	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
C	20	0,279	NDS	0,375	NDS
M	13	-0,013	NDS	-0,019	NDS
O	12	0,132	NDS	0,053	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.4.2 Niveles de CD95 y SFA en membrana total

En el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de maíz se observó que los niveles de CD95 se correlacionaban negativamente con los de SFA en membrana total, mientras que en el resto de grupos no se observó correlación alguna (Tabla 40).

**Tabla 40. Correlación entre los niveles de CD95 y SFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
C	20	-0,059	NDS	-0,088	NDS
M	14	-0,583	0,01	-0,784	0,01
O	12	-0,161	NDS	-0,16	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.4.3 Niveles de CD95 y MUFA en membrana total

En el grupo control los niveles de expresión de CD95 se correlacionaron negativamente con los de MUFA en membrana total de forma significativa. Dicha correlación no se halló en ninguno de los dos grupos de dieta hiperlipídica (Tabla 41).

**Tabla 41. Correlación entre los niveles de CD95 y MUFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
C	20	-0,38	0,05	-0,525	0,05
M	14	0,221	NDS	0,361	NDS
O	12	0,29	NDS	0,402	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.4.4 Niveles de CD95 y PUFA en membrana total

Los niveles de CD95 y PUFA se correlacionaron positivamente en los grupos C y M, mientras que en el grupo O no se halló ninguna correlación (Tabla 42).

**Tabla 42. Correlación entre los niveles de CD95 y PUFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	20	0,337	0,05	0,472	0,05
<b>M</b>	14	0,61	0,01	0,774	0,01
<b>O</b>	12	0,161	NDS	0,096	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

## **3.5 Ratio Cer/SM, indicador de la formación de plataformas de ceramida, Cav1 y ácidos grasos**

### 3.5.1 Ratio Cer/SM en LR y Cav1

No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre la relación Cer/SM en LR y los niveles de expresión de Cav1 (Tabla 43).

**Tabla 43. Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y Cav1.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	20	-0,146	NDS	-0,191	NDS
<b>M</b>	13	0,169	NDS	0,146	NDS
<b>O</b>	12	0,041	NDS	0,067	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.5.2 Ratio Cer/SM en LR y SFA en membrana total

Del mismo modo que en el caso anterior, los niveles de formación de plataformas de Cer en LR y los niveles de SFA en membrana total no se correlacionaron (Tabla 44).

**Tabla 44. Correlación entre la ratio Cer/SM de en LR y SFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	20	0,125	NDS	0,16	NDS
<b>M</b>	13	0,031	NDS	0,098	NDS
<b>O</b>	12	0,097	NDS	0,167	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.5.3 Ratio Cer/SM en LR y MUFA en membrana total

El grupo control mostró una correlación negativa significativa entre la conversión de SM en Cer en LR y los niveles de MUFA de membrana total. Los dos grupos de dieta hiperlipídica no mostraron ninguna relación entre dichos parámetros (Tabla 45).

**Tabla 45. Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y MUFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	20	-0,389	0,05	-0,549	0,05
<b>M</b>	13	-0,18	NDS	-0,102	NDS
<b>O</b>	12	-0,032	NDS	-0,018	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.5.4 Ratio Cer/SM en LR y PUFA en membrana total

La formación de plataformas de Cer y los niveles de PUFA en membrana total no mostraron correlación estadísticamente significativa en ninguno de los 3 grupos. (Tabla 46).

**Tabla 46. Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y PUFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	20	0,196	NDS	0,34	NDS
<b>M</b>	13	-0,077	NDS	-0,095	NDS
<b>O</b>	12	-0,161	NDS	-0,281	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

## **3.6 Grado de malignidad tumoral y niveles de Cav1 y de ácidos grasos**

### 3.6.1 Grado tumoral y niveles de Cav1

En el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa entre el grado tumoral, medido a través de la escala *Scarff*-

*Bloom-Richardson* adaptada a rata (SBR11), y los niveles de Cav1. El grupo C y el grupo M no mostraron correlación entre dichos parámetros (Tabla 47).

**Tabla 47. Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de Cav1.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	10	-0,051	NDS	-0,038	NDS
<b>M</b>	12	-0,047	NDS	-0,028	NDS
<b>O</b>	7	0,685	0,05	0,804	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.6.2 Grado tumoral y niveles de SFA en membrana total

En el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva se halló una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de SFA de membrana total. Dicha correlación no se observó en los grupos C y M (Tabla 48).

**Tabla 48. Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de SFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	10	0,025	NDS	0,038	NDS
<b>M</b>	11	0,135	NDS	0,169	NDS
<b>O</b>	9	0,615	0,05	0,788	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.6.3 Grado tumoral y niveles de MUFA en membrana total

El grado tumoral y los niveles de MUFA de membrana total se correlacionaron positivamente en el grupo de dieta normolipídica. En cambio, en el grupo O dichos parámetros se correlacionaron de forma negativa, y el grupo M no mostró ninguna correlación (Tabla 49).

**Tabla 49. Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de MUFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	10	0,731	0,001	0,858	0,001
<b>M</b>	11	-0,191	NDS	-0,221	NDS
<b>O</b>	9	-0,554	0,05	-0,727	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.6.4 Grado tumoral y niveles de PUFA en membrana total

El grado tumoral y los niveles de PUFA de membrana total se correlacionaron positivamente en el grupo de dieta normolipídica, mientras que en los otros 2 grupos no se halló correlación (Tabla 50).

**Tabla 50. Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y los niveles de PUFA en membrana total.**

	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	10	-0,68	0,05	-0,826	0,01
<b>M</b>	11	-0,038	NDS	-0,023	NDS
<b>O</b>	9	0,369	NDS	0,346	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

## **3.7 Actividad de p21Ras, lípidos principales formadores de *Chol-Rafts*, Cav1 y ácidos grasos**

Estudios previos del grupo investigador demostraron que la dieta de aceite de oliva disminuía la actividad de p21Ras en los adenocarcinomas mamarios experimentales (Ref carciongenesis). En el contexto del presente trabajo, se quiso determinar si existía correlación entre los parámetros estudiados y el grado de activación de p21Ras en dichos adenocarcinomas.

### 3.7.1 Niveles de p21Ras-GTP, e índice de activación de p21Ras, y niveles de lípidos formadores de *Chol-Rafts*

En el grupo O se halló una correlación negativa estadísticamente significativa entre los niveles de p21Ras-GTP y los niveles de Col en LR (Tabla 51A). Por otro lado, los grupos C y M no presentaron dicha correlación. Asimismo, los niveles del índice de activación de p21Ras

(relación entre p21Ras-GTP y p21Ras-total) en el grupo O también mostraron una correlación negativa, mientras que en los otros dos grupos no se halló correlación alguna (Tabla 51B).

**Tabla 51. Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y Col (A) o índice de activación de p21Ras y Col (B).**

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	10	0,118	NDS	0,185	NDS
<b>M</b>	11	0,151	NDS	0,199	NDS
<b>O</b>	11	-0,481	0,05	-0,677	0,05

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	-0,171	NDS	-0,176	NDS
<b>M</b>	11	0,065	NDS	0,08	NDS
<b>O</b>	11	-0,436	NDS	-0,657	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.7.2 Niveles de p21Ras-GTP, e índice de activación de p21Ras, y niveles de Cav1

No se halló ninguna correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y los niveles de expresión de Cav1 en ninguno de los 3 grupos (Tabla 52A). Asimismo, el índice de activación de p21Ras tampoco se correlacionó con los niveles de Cav1 (Tabla 52B).

**Tabla 52. Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y Cav1(A) o índice de activación de p21Ras y Cav1 (B).**

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	10	0,217	NDS	0,268	NDS
<b>M</b>	11	-0,153	NDS	-0,234	NDS
<b>O</b>	11	-0,412	NDS	-0,512	NDS

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	0,286	NDS	0,269	NDS
<b>M</b>	11	-0,37	NDS	-0,443	NDS
<b>O</b>	11	-0,461	NDS	-0,544	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.7.3 Niveles de p21Ras-GTP e índice de activación de p21Ras, y niveles de SFA en membrana total

Los niveles de p21Ras-GTP y los de SFA de membrana total se correlacionaron negativamente en el grupo O, mientras que en los otros 2 grupos no se halló ninguna correlación (Tabla 53A). Además, el grupo C y el grupo O mostraron una correlación negativa estadísticamente significativa entre el índice de activación de p21Ras y los niveles de SFA de membrana total (Tabla 53B).

**Tabla 53. Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y SFA en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y SFA en membrana total (B).**

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	-0,514	NDS	-0,689	0,05
<b>M</b>	11	-0,067	NDS	-0,1	NDS
<b>O</b>	11	-0,515	0,05	-0,62	0,05

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	-0,343	NDS	-0,521	NDS
<b>M</b>	11	-0,289	NDS	-0,371	NDS
<b>O</b>	11	-0,475	0,05	-0,611	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.7.4 Niveles de p21Ras-GTP e índice de activación de p21Ras y niveles de ácido palmítico en membrana total

No se halló ninguna correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y los niveles de ácido palmítico de membrana total en ninguno de los 3 grupos (Tabla 54A). En cambio, el grupo M mostró una correlación negativa estadísticamente significativa entre el índice de activación de p21Ras y los niveles de C16:0. En los grupos C y O no se observó dicha correlación (Tabla 54B).

Tabla 54. Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y ácido palmítico en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y ácido palmítico en membrana total (B).

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	-0,057	NDS	-0,134	NDS
<b>M</b>	11	-0,327	NDS	-0,468	NDS
<b>O</b>	11	-0,436	NDS	-0,573	NDS

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	0	NDS	0,034	NDS
<b>M</b>	11	-0,545	0,05	-0,648	0,05
<b>O</b>	11	-0,396	NDS	-0,545	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

### 3.7.5 Niveles de p21Ras-GTP e índice de activación de p21Ras y niveles de MUFA en membrana total

En el grupo O los niveles de p21Ras-GTP se correlacionaron positivamente con los de MUFA de membrana total de forma significativa. Dicha correlación no se halló en los grupos C y M (Tabla 55A). Asimismo, en los dos grupos de dieta hiperlipídica el índice de activación de p21Ras también se correlacionó positivamente con los niveles de MUFA de membrana total. El grupo C no mostró dicha correlación (Tabla 55B).

Tabla 55. Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y MUFA en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y MUFA en membrana total (B).

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	-0,229	NDS	-0,235	NDS
<b>M</b>	11	0,414	NDS	0,433	NDS
<b>O</b>	11	0,594	0,05	0,704	0,05

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	-0,286	NDS	-0,269	NDS
<b>M</b>	11	0,458	NDS	0,613	0,05
<b>O</b>	11	0,554	0,05	0,695	0,05

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

**3.7.6 Niveles de p21Ras-GTP e índice de activación de p21Ras y niveles de PUFA en membrana total**

No se encontró ninguna correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y los niveles de PUFA de membrana total (Tabla 56A). Asimismo, tampoco se halló correlación alguna entre el índice de activación de p21Ras y los niveles de PUFA (Tabla 56B).

**Tabla 56. Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y PUFA en membrana total (A) o índice de activación de p21Ras y PUFA en membrana total (B).**

<b>A</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	0,4	NDS	0,429	NDS
<b>M</b>	11	-0,327	NDS	-0,498	NDS
<b>O</b>	11	-0,079	NDS	-0,023	NDS

<b>B</b>					
	n	Tau-b de Kendall		Rho de Spearman	
		R	Significación	R	Significación
<b>C</b>	9	0,343	NDS	0,395	NDS
<b>M</b>	11	-0,283	NDS	-0,349	NDS
<b>O</b>	11	-0,04	NDS	-0,005	NDS

NDS: Sin diferencias estadísticamente significativas

---

Introducción

Material y métodos

Resultados

**Discusión**

Conclusiones

Bibliografía



## **A. EVOLUCIÓN PONDERAL, CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y PARÁMETROS DE LA CARCINOGENESIS**

### **1. EVOLUCIÓN PONDERAL**

Admitiendo que el peso corporal es un buen reflejo del desarrollo de los animales, del análisis de la evolución ponderal del ensayo se puede concluir, en primer lugar, la idoneidad de las tres dietas experimentales para producir el crecimiento normal de las ratas del ensayo. Dicho crecimiento fue homogéneo en los 3 grupos experimentales a lo largo del estudio, tal y como reflejó, por una parte, la pequeña magnitud de las diferencias observadas a lo largo del tiempo, así como el paralelismo de las curvas de la evolución ponderal. Asimismo, los coeficientes de variación fueron uniformemente bajos, indicando que no existían diferencias individuales entre los pesos de los animales de un mismo grupo.

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 patologías por desequilibrios nutricionales ([827],[905]). Juntamente con la obtención de una evolución ponderal normal de los animales, ambos hechos permiten concluir que el factor ambiental "dieta" no ejerció un efecto de tipo selectivo sobre los individuos. Por tanto, las diferencias que pudieran observarse en todos los parámetros analizados en este trabajo podrían ser atribuidas a los cambios producidos por la variable dieta, y no a factores inespecíficos resultantes de desequilibrios nutricionales. En caso contrario, los animales se hubieran adaptado, aumentando así la variabilidad de las respuestas individuales. El hecho que las dietas hiperlipídicas no provoquen un aumento de peso, a pesar de su elevado contenido en grasas, estaría relacionado con la capacidad de homeostasia de los animales y con las modificaciones específicas introducidas en las dietas hiperlipídicas en relación a la dieta normolipídica ([2567]). Dichas modificaciones pretenden asegurar la metabolización del exceso de lípidos y evitar su acumulación en los tejidos en forma de triacilglicéridos.

### **2. HISTOPATOLOGÍA MAMARIA**

El tipo de patología que desarrollaron los animales del estudio fueron afecciones mamarias y en su mayor parte, tumores malignos, concretamente adenocarcinomas. Dicho resultado estuvo de acuerdo con lo esperado en el modelo experimental de cáncer de mama

inducido con DMBA ([1438]). El resto de las afecciones mamarias correspondió a patología benigna, siendo el adenoma, el fibroadenoma y la hiperplasia lobulillar las más frecuentes.

El resultado de la caracterización histopatológica de los tumores de rata inducidos en este ensayo corroboró las similitudes que presentan con los tumores humanos, tal y como se describió previamente ([4206], [4264]). Aunque no se encontraron representados todos los tipos histológicos, el patrón arquitectural que más frecuentemente presentaron estos tumores fue el cribiforme, que mostró variaciones en el grado arquitectural, nuclear y otros parámetros, de la misma forma que el carcinoma ductal infiltrante de mama humano. La categorización de los parámetros histopatológicos analizados se realizó en base a indicaciones descritas en estudios propios del grupo realizados previamente ([4264]).

Asimismo, el estudio histopatológico reveló que aunque en los 3 grupos los adenocarcinomas adoptaron un patrón arquitectural mixto, predominantemente cribiforme, éstos fueron menos frecuentes en el grupo O. Por otro lado, los grupos C y O mostraron claramente una tendencia a desarrollar adenocarcinomas de bajo grado arquitectural y nuclear, mientras que el grupo M presentó una mayor distribución de los adenocarcinomas entre los grados II y III, y menos de la mitad de los tumores fueron de grado I. Además, se observó una mayor actividad mitótica en los adenocarcinomas de los grupos M y O respecto al C. Al aplicar el método de clasificación histopatológica adaptado a la rata ([4264]), se observó un mayor porcentaje de tumores de alto grado en el grupo M, mientras que los del grupo de dieta de aceite de oliva fueron similares al control. En cuanto a la reacción estromal o desmoplasia, la mayoría de los adenocarcinomas de todos los grupos experimentales presentaron nula o leve reacción estromal, siendo el grupo O el que mostró una mayor proporción de tumores sin dicha característica. Otros parámetros histológicos analizados fueron la necrosis tumoral y el infiltrado inflamatorio (datos no mostrados). Los adenocarcinomas del grupo M fueron los que mostraron en mayor grado dichas características.

Estos datos indican que las dietas con elevado contenido en lípidos comportan cambios histopatológicos en los adenocarcinomas de mama y que dicho efecto es distinto según el tipo de lípido administrado. Los tumores del grupo alimentado con dieta hiperlipídica de aceite de maíz fueron los que presentaron unas características morfológicas de mayor agresividad. En cuanto a los tumores del grupo alimentado con la dieta hiperlipídica de aceite de oliva, éstos presentaron características de menor grado de malignidad, similares a los tumores del grupo control (bajos grados arquitectural, nuclear y bajo grado en la escala

SBR11), aunque alguna de estas características, como el número de mitosis, fue intermedia entre el grupo C y el grupo M.

### **3. PARÁMETROS DE LA CARCINOGENESIS**

El estudio del **tiempo de latencia** reveló una tendencia de los tumores mamarios malignos a aparecer antes en el grupo alimentado con dieta hiperlipídica de aceite de maíz respecto al grupo control y al alimentado con dieta rica en aceite de oliva virgen extra. Otros autores ya han sugerido que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz aceleraría la aparición de tumores y, por lo tanto, tendría un efecto promotor de la carcinogénesis mamaria ([1106],[3060],[3615]). Dicho efecto no se observó en el grupo de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra. La falta de significación estadística de los resultados podrían explicarse por la gran dispersión de datos y por los valores de incidencia inferiores al 100% que hacen que el número de efectivos pueda no haber sido suficiente. En este sentido, debe remarcarse que el diseño experimental del estudio se justifica por la conveniencia de utilizar el menor número de animales para obtener la cantidad de muestras necesarias para los estudios posteriores de biología molecular, así como por las razones de practicabilidad.

En cuanto a la **incidencia de afectación**, ésta fue aumentando significativamente a lo largo del estudio en todos los grupos experimentales. El grupo M mostró un comportamiento diferente al de los otros dos. Así, dicho grupo mostró un rápido aumento de la incidencia durante las primeras etapas, que se estabilizó posteriormente hasta el final del estudio. Este comportamiento está relacionado con el menor tiempo de latencia de este grupo. En cambio, en los grupos C y O el aumento de la incidencia se dio más lentamente, acompañado de una estabilización más tardía. La comparación de las curvas mostró que el grupo M fue el de mayor incidencia de afectación. Por otro lado, el grupo O mostró valores superiores de incidencia que el grupo C, a diferencia de lo observado en otros parámetros. En el momento del sacrificio, el grupo M fue el de mayor incidencia de afectación mientras en el grupo O la incidencia fue intermedia entre este grupo y el control. Sin embargo, en este momento las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto sería debido a la menor capacidad resolutoria del test estadístico, ya que el sacrificio representa un único punto, a diferencia del estudio temporal que recoge la información de las 26 palpaciones.

Globalmente, estos resultados indicarían que las dietas hiperlipídicas aumentarían la incidencia de animales afectados de cáncer de mama inducido con DMBA y que este efecto sería superior para las dietas ricas en PUFA n-6 que para las ricas en MUFA n-9.

Un aspecto interesante a considerar, a partir de la observación de las curvas de incidencia a lo largo del tiempo, sería el comportamiento de este parámetro en la última etapa del estudio. Se pudo observar una tendencia de las curvas a la estabilización sin llegar al valor máximo. Esta situación es, en parte, propia del modelo experimental. De este modo, dosis pequeñas de DMBA, como la del presente estudio (5 mg), producirían incidencias inferiores al 100% ([4003]). Por el contrario, la administración de este iniciador de la carcinogénesis en cantidades importantes (20 mg) provoca una incidencia de afectación prácticamente del 100% en el mismo tipo de ensayo ([442],[798]). Esta relación dosis-efecto ha sido también observada en otras series experimentales realizadas en el propio laboratorio ([1295],[1299],[4205]).

El estudio de la evolución del **contenido tumoral total** a lo largo del tiempo indicó un aumento del número de tumores en todos los grupos experimentales durante el estudio. Cabe destacar, que no se observó una saturación de este parámetro hacia el final del estudio, lo que sugiere que con la dosis de carcinógeno utilizada y la duración del estudio no se llegó al máximo de posibilidades en cuanto al contenido tumoral. Tal situación difiere de la obtenida en trabajos anteriores del grupo investigador utilizando 20 mg DMBA/animal ([1883],[2567]). Respecto a las diferencias debidas a los lípidos de la dieta, los resultados obtenidos concordaron con lo esperado. El grupo M presentó un número significativamente mayor de tumores que el resto de grupos, tal y como también ha sido observado por otros autores ([3615],[3977]). En cuanto al grupo alimentado con dieta hiperlipídica de aceite de oliva, el número de adenocarcinomas aparecidos fue el más bajo de todos los grupos, incluido el control. Estos datos sugieren, por tanto, que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, además de acelerar la aparición clínica de los tumores mamarios, también aumentaría su número. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva tendría un efecto negativo sobre la aparición de los tumores.

En relación al **volumen tumoral total**, éste también fue aumentando a lo largo del estudio en todos los grupos experimentales. El grupo M presentó valores significativamente mayores, mientras que el grupo O presentó valores significativamente menores que el grupo C. Nuevamente, estos datos indicarían, por una parte, el efecto estimulador de la dieta

hiperlipídica de aceite de maíz sobre la carcinogénesis mamaria experimental, acelerando el crecimiento tumoral, y, por otra, el posible efecto protector de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra. Dicho efecto protector, reflejado tanto en el menor crecimiento de los tumores como en los parámetros anteriormente descritos, se produciría a pesar de ser una dieta hiperlipídica. Por tanto, esta dieta habría ejercido un efecto específico inhibiendo el crecimiento tumoral, efecto que sería superior al efecto estimulador inespecífico debido al elevado aporte energético de las dietas hiperlipídicas ([1962],[4007]).

En definitiva, se puede concluir que los dos tipos de dieta hiperlipídica ejercerían efectos en la carcinogénesis mamaria experimental. En todos los parámetros analizados, los valores de los animales del grupo alimentado con la dieta de aceite de maíz fueron significativamente superiores a los de dieta normolipídica. La aparición más rápida, el mayor número de tumores y la mayor masa tumoral de este grupo fueron compatibles con un mayor grado de malignidad de la enfermedad cancerosa. Estos datos indican el efecto promotor de las dietas ricas en PUFA n-6 sobre la carcinogénesis mamaria. Por otro lado, en relación con la dieta rica en aceite de oliva, los valores del grupo O fueron generalmente inferiores al grupo C. Estos resultados serían concordantes con un efecto protector de este tipo de dieta. Sólo el parámetro de incidencia del grupo O no siguió esta tendencia, lo cual podría explicarse por el efecto ya comentado anteriormente del aporte calórico de las dietas hiperlipídicas sobre los tumores. Dicho aporte calórico beneficiaría al tejido tumoral dado que, como ha sido ampliamente descrito en la bibliografía, las células tumorales requieren de un aporte energético elevado por su alta tasa de proliferación ([1962],[4007]).

Los resultados de este estudio están de acuerdo con los de otros autores obtenidos en diversos modelos experimentales (véase apartado D de la introducción) en relación a las dietas ricas en PUFA n-6, donde se describe su efecto promotor ([1358],[3568],[3672],[4324]). En cuanto a la influencia de las dietas ricas en aceite de oliva virgen en la carcinogénesis mamaria, ésta ha sido menos estudiada y además existen resultados discordantes. Esto se debe a la gran heterogeneidad existente en los planteamientos experimentales de los estudios, fundamentalmente en relación a la utilización de distintos tipos y variedades de aceite de oliva. Así, numerosos autores atribuyen a las dietas de aceite de oliva un efecto protector sobre la carcinogénesis mamaria; sin embargo, algunos trabajos no indican ningún efecto significativo de esta dieta sobre dicha carcinogénesis, e incluso se ha descrito un débil efecto promotor ([3019],[3568],[3840],[3860],[3861],[4300]). Los

resultados del presente estudio mostraron que la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen, con elevado contenido en MUFA n-9 y numerosos componentes bioactivos, ejercería fundamentalmente un efecto protector. Algunos autores han sugerido que el posible efecto beneficioso del aceite de oliva no sería debido únicamente a la elevada cantidad de ácido oleico (18:1n-9) sino también a un aporte insuficiente de ácido linoleico (18:2n-6), ya que se necesitaría una cierta cantidad de este ácido graso, como precursor de eicosanoides, para una óptima promoción de la carcinogénesis mamaria ([3205]). Los eicosanoides parecen ejercer un importante papel en el desarrollo tumoral y metastásico ([3114]). En relación a esta hipótesis, la inhibición competitiva por el ácido oleico de la  $\Delta 6$ -desaturasa, el primer paso de la biosíntesis de eicosanoides, podría explicar en gran parte la progresión más lenta y/o los efectos inhibidores del aceite de oliva observados. Así, aunque el ácido oleico presenta una menor afinidad por la  $\Delta 6$ -desaturasa que el ácido linoleico, a concentraciones relativamente altas de ácido oleico, éste es capaz de suprimir la actividad de la enzima, e inhibir el crecimiento tumoral mamario ([3421]). De hecho, en el modelo experimental de la carcinogénesis mamaria inducida con N-nitroso-N-methylurea (NMU), las variedades de aceite de oliva con una menor relación ácido linoleico/ácido oleico (relación 0.07) provocaron menor número de adenocarcinomas que el resto de variedades ([3852]). La variedad hojiblanca, utilizada en el presente trabajo, contiene una proporción de ambos ácidos del 8.24% y 79.03% respectivamente (relación 0.1). Además, contiene una proporción de ácidos grasos saturados menor que otras variedades, lo que probablemente también podría haber influido en los efectos finales del aceite de oliva sobre el cáncer de mama dado el efecto promotor de estos ácidos grasos ([4351]). Por último, cabe destacar el papel que diversos componentes minoritarios del aceite de oliva virgen extra ( $\alpha$ -tocoferol - vitamina E -, compuestos fenólicos - hidroxitirosol, oleuropeina y lignanos -, fitosteroles -  $\beta$ -sitosterol y D5-avenasterol -, flavonoides - rutina, luteína -, y el hidrocarburo triterpénico escualeno ([3018],[3570],[3619]) parecen desempeñar sobre la carcinogénesis y que también habrían contribuido al efecto protector de este aceite. Así, los antioxidantes escualeno y fenoles parecen poseer un potencial anticancerígeno ([3854]). Estudios experimentales muestran que el escualeno puede inhibir eficazmente la tumorigénesis de colon, pulmón y piel inducidas químicamente, siendo este efecto protector observado cuando el escualeno es administrado antes o durante el tratamiento con el carcinógeno ([4829]). Estas sustancias evitarían la peroxidación lipídica y en consecuencia, la formación de radicales libres, oxidantes del material genético y de proteínas ([3154],[3229]). Se ha demostrado que la peroxidación lipídica de las membranas celulares de animales alimentados con aceite de oliva virgen es

menor que en animales alimentados con otros aceites como el de girasol o maíz ([4631],[4633]). En este sentido, Owen et al. describieron una mayor actividad antioxidante de los extractos de aceite de oliva virgen extra que de los de aceites de semillas y aceite de oliva refinado ([4743],[4802]).

A pesar de la dificultad que supone la extrapolación de los resultados que se obtienen en los modelos animales al cáncer humano, los resultados obtenidos en este trabajo indican una serie de propiedades de los lípidos estudiados que permitirían extraer algunas recomendaciones dietéticas en los humanos. En este sentido, el claro efecto estimulador de las dietas ricas en lípidos poliinsaturados de la familia n-6 y el posible efecto inespecífico hallado de las elevadas cantidades del aceite de oliva sobre la incidencia de afectación, indicarían la conveniencia de reducir el consumo total de grasas en la dieta asegurando los requerimientos mínimos diarios de ácidos grasos esenciales. En segundo lugar, si se tiene en cuenta el efecto fundamentalmente protector manifestado por el aceite de oliva virgen extra, aún cuando ha sido administrado en grandes cantidades, se podría concluir que además de reducir la cantidad total de grasa ingerida en la dieta, sería quizás conveniente desequilibrar el contenido lipídico de ésta hacia aquellos tipos que manifiestan acciones protectoras. Entre tales lípidos se encontrarían el aceite de oliva virgen extra y, tal y como han demostrado diversos autores, ciertos aceites de origen marino ricos en PUFA n-3 de cadena larga. Respecto al aceite de oliva, cabe destacar que, una vez contrastados los diferentes resultados obtenidos en los diversos estudios publicados sobre el tema, incluidos los del presente trabajo, su potencial efecto protector de la carcinogénesis mamaria estaría directamente relacionado con el tipo y la variedad de aceite utilizado. Asimismo, el contenido relativo del aceite de oliva virgen en ciertos componentes minoritarios con propiedades antioxidantes sería otro de los factores clave a considerar en su efecto final. En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el consumo moderado y regular de aceite de oliva virgen, con las características anteriormente descritas, y/o de aceites de origen marino, asociado a una reducción de los otros tipos de grasas en la dieta, podrían representar un hábito dietético saludable en relación al cáncer de mama.

## **B. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE AISLAMIENTO DE DOMINIOS DE MEMBRANA EN HÍGADO DE RATA Y SU VALIDACIÓN EN ADENOCARCINOMAS MAMARIOS**

Desde que se planteara la hipótesis de que la membrana no era un mosaico fluido ([8402]), tal y como lo describieron Singer y Nicolson en los años 70 ([5476]), ha habido mucha controversia sobre si las DRMs realmente existían o, al contrario, eran un artefacto que se creaba al aislar las membranas en el laboratorio bajo ciertas condiciones experimentales, como sería el caso de utilizar detergentes no iónicos (Revisado en [7514]). En los últimos años, sin embargo, gracias a la aparición de técnicas de microscopia de *super resolution* se han podido observar dichas estructuras en células vivas, demostrando así su existencia ([8237]).

Hasta el momento, han sido escasos los trabajos que han reportado métodos de aislamiento de DRMs en tejidos de rata. La gran mayoría han sido aplicados en tejido nervioso ([6164],[6165],[6166]), aunque también existen algunos trabajos en glándula submaxilar ([6286]), adipocitos ([6280]) y hepatocitos ([6991]). Debido a la falta de métodos validados para aislar DRMs de tejido tumoral, en este trabajo se consideró imprescindible estandarizar un procedimiento adecuado para los adenocarcinomas mamarios experimentales. Debido al gran valor que tienen dichas muestras, la estandarización del método de aislamiento se llevó a cabo en un órgano que no fuera tejido diana del carcinógeno y cuyo tamaño permitiera realizar todas las pruebas necesarias para conseguir la mejor eficacia de aislamiento. De este modo, se escogió el hígado de animales sanos como tejido para estandarizar la técnica de aislamiento de DRMs tomando como referencia un método de obtención de DRMs en tejido neuronal de rata descrito por Mukherjee et al. ([6439]), posteriormente modificado ([6164]).

Los diferentes métodos de aislamiento de DRMs que se han publicado varían, fundamentalmente, en la composición del tampón de homogenización y en el detergente no iónico utilizado en el mismo ([6286]). Por otra parte, las características utilizadas para diferenciar entre DRMs o LR y caveolas y MS son su composición en proteínas totales, el contenido en colesterol y la presencia de proteínas marcadoras y específicas de los diferentes dominios de membrana ([6439],[6856]). En consecuencia, las distintas pruebas que se hicieron a lo largo del proceso de estandarización del método conllevaron el ensayo de varios

tampones de homogenización, diferentes volúmenes de los mismos y diferentes cantidades de muestra. Así, formando parte del tampón de homogenización se probaron dos detergentes no iónicos diferentes, Brij98 y Tritón X-100, con temperaturas de solubilidad de 37°C y 4°C, respectivamente. En cuanto a los volúmenes de dicho tampón, éstos variaron entre 8 y 10 respecto a la cantidad de muestra utilizada. Asimismo, se ensayaron dos gradientes de sacarosa distintos, que diferían en los porcentajes de las diferentes soluciones de la misma, con el objetivo de comparar cuál de ellos presentaba una mayor eficiencia.

Los resultados obtenidos mostraron que el gradiente B (1.5 mL de sacarosa 15%, 8 mL de sacarosa 36% y 2.5 mL de sacarosa 41%) incubado 1 hora separaba mejor las diferentes fracciones de membrana que el gradiente A (2.5 mL de sacarosa 15%, 8 mL de sacarosa 36% y 2.5 mL de sacarosa 41%), basándose en la localización de la bomba Na/K ATPasa y el rTf, proteínas características de MS ([6280],[6286]. También se determinó que el detergente no iónico Tritón X-100 a +4°C proporcionaba mayor rendimiento en la obtención de DRMs que el detergente Brij98. Finalmente, se obtuvieron 12 fracciones (de diferente densidad) que fueron analizadas bioquímicamente con el fin de identificar a qué dominios de membrana correspondían.

El análisis del contenido en proteínas totales de las diferentes fracciones de membrana obtenidas en tejido hepático mostró que alrededor del 80-85% de proteínas se localizaron en las fracciones de mayor densidad (localizadas en el fondo del tubo), mientras que las fracciones de menor densidad presentaron un nivel muy bajo e incluso nulo de proteínas totales. Este resultado concordó con los obtenidos por otros autores ([6164],[6165]). Por otro lado, la mayor parte de colesterol se distribuyó entre las fracciones 2, 3, 4, 9 y 12, indicando, por tanto, que una gran parte de dicho lípido se encontraba en fracciones de baja densidad, pero que también existía una relativa abundancia de Col en algunas fracciones de alta densidad. Asimismo, se observó que las fracciones 2, 3, 4 y 5 mostraban la presencia de Flot1, y que además la fracción 3 también contenía Cav1. Finalmente, en las fracciones de mayor densidad (10, 11 y 12) se encontraron los mayores niveles de la proteína rTf.

En conjunto, estos resultados permitieron concluir que el método utilizado para separar las fracciones de membrana en tejido hepático de rata era válido y mostraba un buen rendimiento en el aislamiento de DRMs. Así, éste permitió definir diferentes dominios de membrana a través de sus características bioquímicas. De este modo, en tejido hepático se determinó que las fracciones 2, 3, 4 y 5 correspondían a LR, por su baja densidad en proteínas

totales, su alto contenido en Flot1 y la presencia de Col. Asimismo, la fracción 3 se consideró la fracción enriquecida en caveolas, debido a que además de presentar las características bioquímicas de LR, era la de mayor expresión de Cav1. Finalmente, se estableció que las fracciones 10, 11 y 12 formaban la MS, dado su alto contenido en proteínas totales y la presencia de rTf. El alto contenido en Col que se halló en la fracción 12 probablemente responde a razones metodológicas relacionadas con las características del método utilizado para su cuantificación. Basándose en la bibliografía ([6165]), se utilizó un *kit* comercial para determinar el contenido de Col. Sin embargo, dicho *kit* está diseñado para muestras de sangre o plasma humanos y su nivel de sensibilidad es adecuado para cantidades de Col superiores a las halladas en este trabajo. En cualquier caso, globalmente, dichas características estuvieron de acuerdo con la definición de los diferentes dominios de membrana ([5447],[5448],[5498]), validando el método estandarizado para el aislamiento de DRMs en tejidos animales.

Una vez puesto a punto el método de aislamiento de DRMs en hígado, se procedió a su validación en los adenocarcinomas mamarios del estudio.

El análisis del contenido total de proteínas mostró un patrón similar en todos los grupos experimentales. Aproximadamente el 60% de proteínas totales se detectaron en las fracciones 10, 11 y 12, consideradas las de alta densidad. Por otro lado, se analizó el contenido en Col y SM, como principales lípidos formadores de LR, de las diferentes fracciones, esta vez utilizando como método de análisis la TLC. Los resultados indicaron que, en las condiciones del análisis, todo el contenido en colesterol de las membranas de los adenocarcinomas mamarios experimentales se hallaba en las fracciones de baja densidad (1 a 5). La SM presentó la misma distribución que el colesterol a excepción de la fracción 5, donde no se detectó SM. Finalmente, en las fracciones 1, 2, 3 y 4 se halló Flot1, en la fracción 2 de la mayoría de muestras se detectó la mayor cantidad de Cav1, y en las fracciones 4 hasta la 12 se encontró rTf. Cabe destacar que en un número limitado de muestras, la fracción enriquecida en caveolas no se halló en la fracción 2. Así en el grupo C, en un 20% de las muestras analizadas la fracción enriquecida en caveolas residió en la fracción 1 y en el grupo M una única muestra (correspondiente al 7%) presentó la mayor abundancia de Cav1 en la fracción 3. Dichas diferencias se atribuyeron a la variabilidad inter-experimental del método utilizado.

Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos en hígado, se observaron algunas diferencias en relación a la localización de colesterol y de las proteínas marcadoras.

En concreto, la principal diferencia entre ambos tejidos se halló en el contenido de Col de cada una de las fracciones. El hecho de que los resultados obtenidos con la TLC correspondieran totalmente con el perfil esperado según la diferente naturaleza de las fracciones, permitió concluir que dicha técnica es idónea para cuantificar niveles de colesterol en rata. Por otro lado, las pequeñas diferencias observadas en la localización de las proteínas marcadoras entre ambos tejidos, concretamente de Cav1, podrían atribuirse, en parte, a las diferencias intrínsecas de los dos tejidos, ya que existen evidencias de que la composición de las DRMs pueden variar en los diferentes tejidos ([6288],[6291]). Dado que, en general, las características observadas de las diferentes fracciones de membrana, agrupadas en dominios, se ajustaron a la definición de cada uno de ellos ([5447],[5448]), puede concluirse que el método estandarizado para su aislamiento también resultó idóneo para el análisis del tejido tumoral mamario de la rata.

## **C. CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES**

Una vez validado el método de obtención de DRMs en adenocarcinomas mamarios, se procedió a caracterizar la composición lipídica de la membrana total y de sus dominios en dichos tumores.

En **membrana total** se detectaron únicamente 4 tipos de lípidos: TAG, Cer, Col y PC, siendo TAG y Cer los mayoritarios en todos los grupos experimentales, seguidos de Col y, finalmente, de PC. Los elevados niveles de TAG detectados en membrana constituyeron un resultado inesperado, ya que estos lípidos, dada su naturaleza no anfipática, en principio, no pueden mezclarse con los fosfolípidos de la membrana ([8405]). Por otro lado, los altos niveles de Cer podrían constituir un rasgo característico de las células tumorales, dado que se ha descrito que la formación de plataformas de Cer tiene un papel importante en el balance proliferación-apoptosis propio de las células cancerosas ([6289]). Estos hallazgos se discutirán más detalladamente al tratar los resultados obtenidos en los diferentes dominios de membrana. Por otra parte, el hecho de que se detectase un único fosfolípido, PC, sería debido al contenido relativamente bajo de este tipo de lípidos, en comparación al resto. De entre los distintos tipos de fosfolípidos, PC fue el mayoritario. Aún así, en membrana total se habría producido un efecto de dilución de este tipo de lípidos, de manera que sus niveles se

encontrarían por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica utilizada. Cabe destacar que aunque el método descrito por Ochoa et al. ([7057]) modificado permite cuantificar hasta niveles de pmol/ $\mu$ g de proteína, los lípidos presentes en cantidades relativamente bajas no pudieron ser detectados en este trabajo.

En cuanto al contenido en ácidos grasos, los SFA, considerados en conjunto, fueron los mayoritarios independientemente del grupo experimental, de forma estadísticamente significativa en el grupo C respecto al total de PUFA, en el grupo M respecto al total de MUFA y PUFA, y en el grupo O respecto al total de MUFA. Además, el contenido total en MUFA fue más alto que el de PUFA en los grupos C y O, a diferencia de lo ocurrido en el grupo M que mostró mayor cantidad de PUFA que de MUFA. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por otros autores ([8407]). En este sentido, cabe destacar que la ratio entre ácidos grasos insaturados totales (TUFA) y ácidos grasos totales (TFA) ha sido descrita como indicador de agresividad tumoral, de manera que una mayor ratio TUFA/TFA se asociaría a menor agresividad ([8452]). En este trabajo dicha ratio fue de 0.56 en el grupo control, seguido del grupo de aceite de oliva (0.49) y finalmente del grupo de aceite de maíz (0.47), lo cual estaría de acuerdo con lo descrito. Por otra parte, cuando se consideraron los ácidos grasos individualmente, se observaron ciertas diferencias entre grupos, de manera que en los grupos control y de dieta de aceite de maíz el ácido graso más abundante fue el ácido palmítico (C16:0), mientras que en el grupo de dieta de aceite de oliva el mayoritario fue el ácido oleico (C18:1 n-9).

Los resultados obtenidos, por tanto, indicarían cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana de los adenocarcinomas mamarios en función de la dieta administrada. Así, en el grupo M, en comparación con el grupo control, los PUFA fueron más abundantes que los MUFA, sugiriendo un enriquecimiento de la membrana tumoral en este tipo de ácidos grasos. Asimismo, en el grupo O se habría producido un enriquecimiento en ácido oleico, en detrimento del ácido palmítico, ácido graso mayoritario en la membrana tumoral de los grupos C y M. Cabe destacar que el ácido oleico es el principal ácido graso del aceite de oliva en general y, en concreto, de la variedad hojiblanca utilizada en este trabajo. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que demuestran que los ácidos grasos administrados a través de la dieta pueden ser incorporados y, por tanto, enriquecer, las membranas celulares ([7799],[7806]). Este hecho será discutido más ampliamente en este mismo capítulo.

En **membrana soluble** sólo se detectaron Cer, TAG y Col. El lípido mayoritario fue Cer en los grupos C y O, y TAG en el grupo M. En cambio, el lípido que se detectó en menor concentración en este dominio de membrana en todos los grupos fue Col. El resto de lípidos se hallaron en concentraciones por debajo de la sensibilidad de la técnica y, por tanto, no pudieron ser detectados.

Del mismo modo que en membrana total, la riqueza en TAG de MS también resultó inesperada. Asimismo, resultó sorprendente detectar elevados niveles de Cer en este dominio, ya que, en principio, éste es un lípido propio de LR, implicado en procesos de apoptosis ([7435],[7439]). Además del posible enriquecimiento en Cer de las células tumorales ya comentado, es probable que las membranas de los adenocarcinomas mamarios experimentales presenten también altos niveles de Cer redistribuida en MS, sin formar plataformas o *Rafts*, como moléculas individuales con un papel estructural. Se ha descrito que dichas moléculas se reagrupan al recibir un estímulo externo que active la enzima SMAse para, posteriormente, activar la vía apoptótica extrínseca ([7442]). Los resultados obtenidos en MS también mostraron un cierto contenido en Col, así como baja o nula presencia de fosfolípidos. Debido a que una de las principales características descritas de MS es su relativo bajo contenido en Col y su alto contenido en fosfolípidos ([5383]), estos resultados podrían sugerir un cierto enriquecimiento en Col de las membranas tumorales, tal como ha sido descrito por otros autores ([8379]).

La composición en ácidos grasos en MS se halló levemente modificada a causa de la dieta, ya que los dos grupos de dieta hipelipídica mostraron una mayor cantidad de C20:4n-6 en este dominio de membrana, en comparación con el grupo control, cuyo ácido graso principal fue el ácido oleico. Por otro lado, estos dos grupos presentaron una misma distribución relativa de ácidos grasos, siendo los SFA los mayoritarios, seguidos de PUFA y MUFA, mientras que el grupo C presentó mayores niveles de MUFA. Los resultados sugieren, por tanto, que algunos de los lípidos incorporados a través de la dieta podrían ejercer su efecto en la MS, tal y como se ha descrito en otros trabajos ([3920],[7572]). Cabe destacar que el aceite de oliva virgen extra y el aceite de maíz tuvieron un efecto similar sobre la composición en AG de la MS, ya que ambos aumentaron el contenido en PUFA n-6, y concretamente en ácido araquidónico, respecto al control. Este hecho podría deberse a que aunque el ácido graso mayoritario del aceite de oliva virgen es el ácido oleico, este aceite también presenta importantes cantidades de ácido linoleico (véase composición en tabla 2),

precursor del araquidónico. De este modo y al tratarse de dietas hiperlipídicas, las cantidades de ácido linoleico administradas que se incorporarían en la membrana serían altas en el caso de ambas dietas, sobre todo debido a la dieta del aceite de maíz, provocando así el mismo tipo de cambios en los dominios de membrana donde los PUFA n-6 parecen tener un mayor impacto, tal como se discutirá más ampliamente en el apartado D de esta discusión.

En relación a los *Lipid Rafts*, se detectaron hasta un total de nueve tipos de lípidos distintos. Con independencia del grupo experimental, los lípidos mayoritarios fueron, en orden de mayor a menor abundancia: Cer, TAG, Col y PC. Tal y como se comentará en el siguiente apartado, solamente se hallaron diferencias por efecto de la dieta en algunos de los lípidos minoritarios (PE, SM, LPC, PS y PI).

El hecho de que los lípidos más abundantes en LR se mantuvieran constantes independientemente de la dieta, sugiere una composición relativamente conservada de estos microdominios. Ello podría estar relacionado con el importante papel que éstos desempeñan tanto en células normales, manteniendo la homeostasis celular, como en tumorales, actuando como plataformas de vías de señalización, como en el caso de células tumorales de mama ([8235]). Así, los elevados niveles de Cer hallados estarían de acuerdo con los datos que indican que las membranas tumorales y sus dominios son ricos en este tipo de lípido, en relación con el aumento de las señales apoptóticas propio de las células tumorales ([8382]). Por otra parte, el hecho que los niveles de Col y PC también fueran similares en los diferentes grupos, está de acuerdo con el importante papel de ambos lípidos en los LR. Por una parte, el Col se ha descrito fundamental para la formación y mantenimiento estructural de los LR ([8383],[8412]) y, por otra, la PC desempeña una función importante en vías de proliferación celular ([8412]), esenciales para la célula tumoral. Además, se ha descrito la presencia de Col y PC en zonas de la membrana con alta condensación y menos fluidas ([8392]). Tal y como sucedió en membrana total y MS, los niveles de TAG en LR fueron elevados, hecho que será discutido más adelante.

Desgraciadamente, en LR no se pudo analizar la composición en ácidos grasos debido a la naturaleza de las muestras, a problemas técnicos y, sobre todo, a la falta de disponibilidad de muestras. En la figura 2 del Anexo se muestra un cromatograma representativo de LR, en el se aprecia la falta de sensibilidad de la técnica en este tipo de muestras del estudio.

Finalmente, en **caveolas** los tres grupos experimentales mostraron el mismo perfil de lípidos siendo éste, a su vez, muy parecido al de LR. Dado que las caveolas constituyen un subtipo de LR, era de esperar que su composición en lípidos fuera semejante. Cabe destacar, sin embargo, que los valores de los diferentes tipos de lípidos en caveolas fueron del orden de casi 2 veces mayores que los de LR. Ello sería, posiblemente, debido al efecto de dilución que se produce al trabajar con un *pool* de fracciones como es el caso de LR. En caveolas, los ácidos grasos tampoco pudieron ser analizados debido a falta de disponibilidad de muestras y a problemas metodológicos.

Una vez caracterizada la composición lipídica de la membrana y sus dominios, se compararon los niveles de lípidos entre éstos. En la mayoría de los casos los valores más altos fueron hallados en la fracción enriquecida en caveolas, seguida de LR y, finalmente, de MS, donde se hallaron en menor cantidad. En esta parte del estudio quedó patente el mencionado efecto de la dilución. En general, dichas características se mantuvieron más o menos constantes en los diferentes grupos experimentales. Sorprendentemente, los TAG fueron los únicos que no mostraron diferencias en su contenido entre los diferentes dominios de membrana en los grupos de dieta hiperlipídica. Este hecho se discutirá a continuación.

Tal y como ya se ha mencionado, la presencia de TAG en cantidades relativamente elevadas tanto en membrana total como en los distintos dominios analizados en todos los grupos experimentales constituyó un resultado inesperado y, a priori, difícil de explicar. Por su naturaleza, este tipo de lípidos neutros no forman parte de la membrana plasmática ([8405]). La búsqueda en la literatura internacional de trabajos con resultados similares permitió comprobar que, en general, en la mayoría de los casos o no se detectaban o bien su presencia no era justificada por los autores ([8392]). Sin embargo, una búsqueda más exhaustiva permitió hipotetizar que los resultados obtenidos en este trabajo podrían relacionarse con la presencia de *lipid droplets* (LD) o gotitas lipídicas en las células tumorales mamarias. Los LD se han descrito como acúmulos de TAG y ésteres de colesterol, recubiertos de una monocapa de fosfolípidos procedentes del retículo endoplasmático, localizados en el citoplasma celular y, en principio, en diferentes tejidos, con función de reserva energética ([8438][8443]). Resulta interesante que en estudios recientes *in vitro* se ha demostrado que células sometidas a ciertos tipos de estrés, como por ejemplo un medio pobre en nutrientes o con altas cantidades de ácidos grasos, presentaban niveles elevados de LD como mecanismo de supervivencia celular frente al estrés ([8393]). Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de la

presencia de LD en células tumorales. Además, el análisis histopatológico de los adenocarcinomas mamarios del estudio había revelado previamente la existencia de gotitas lipídicas, sobre todo en las muestras de los dos grupos de dieta hiperlipídica (datos no mostrados), que podrían ser compatibles con la presencia de dichas estructuras. Sin embargo, el hecho de ser estructuras citoplasmáticas resultaba paradójico con su detección en membrana. En este sentido, se ha podido constatar, en base a la literatura, que los procedimientos de obtención de LD comparten ciertas características con los del aislamiento de DRMs, como por ejemplo la utilización de un gradiente de densidad y la ultracentrifugación. En dichos procedimientos se describe que los LD quedan suspendidos en una capa grasa de color blanco en la parte superior del tubo ([8394]). Esta situación remeda lo ocurrido en este trabajo durante el aislamiento de las DRMs en las muestras tumorales, en la cual la mayoría de muestras presentaban una capa grasa blanquecina en la parte superior del gradiente. Por tanto, resulta lógico pensar que a medida que se procedía a la recogida de las distintas fracciones mediante aspiración desde la parte superior del tubo, este material fuera "arrastrado" a lo largo del gradiente. Esta situación experimental explicaría la presencia de TAG en la membrana de las muestras del estudio. Además, el hecho que los niveles de TAG fueran parecidos en los diferentes dominios de la membrana apoyaría la hipótesis de que dicha capa grasa hallada en la parte superior del gradiente, y posteriormente arrastrada, correspondiera a los TAG. En caso de confirmarse esta hipótesis, estos resultados indicarían que los métodos de aislamiento de DRMs realizados en algunos tejidos permiten también la separación de estructuras que no forman parte de la membrana plasmática celular, como las endomembranas de distintos orgánulos, lo que debería tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Globalmente, la caracterización del contenido lipídico de la membrana de los adenocarcinomas mamarios experimentales realizada en este estudio indicaría que dicha membrana y sus dominios estarían enriquecidos en Cer y Col y que los fosfolípidos se hallan en cantidades inferiores tanto en LR como en caveolas y, sobretodo, en MS, dónde se encuentran por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica utilizada. Estos resultados, por tanto, ponen de manifiesto el cambio en la composición lipídica de la membrana asociado al proceso tumoral. Sería interesante analizar el contenido en lípidos de las membranas celulares de la glándula mamaria normal y comparar ambos tejidos. Tal y como ya se ha discutido, el enriquecimiento de la membrana en Cer y Col podría ser un reflejo del balance proliferación-apoptosis propio de las células tumorales. El enriquecimiento en Col indicaría una elevada

presencia de *Chol-Rafts*, implicados en vías de proliferación celular ([6289],[8382]), y la riqueza en Cer indicaría la formación de *Cer-Rafts* para iniciar vías de muerte celular ([8390]). En cuanto al contenido en ácidos grasos, se ha determinado que las membranas de los adenocarcinomas mamarios experimentales contienen, sobretodo, SFA, y en menor cantidad MUFA y, finalmente, PUFA. Además, los resultados indican que dicha composición se modifica por efecto de la dieta, tal y como muestran las diferencias halladas en el contenido de MUFA y PUFA, tanto en membrana total como en MS, en los grupos de dieta hiperlipídica en relación al control. Este hecho será discutido ampliamente en el siguiente apartado al tratar los efectos de los lípidos de la dieta.

Con la información disponible, no se han encontrado estudios en los que se haya caracterizado la composición lipídica de la membrana plasmática de los adenocarcinomas mamarios experimentales, por lo que se considera que el presente trabajo aporta nuevos datos al respecto y podría ser de interés y utilidad cuando se trabaja con este tipo de tumores, situación relativamente frecuente al tratarse de uno de los modelos experimentales de cáncer de mama *in vivo* más utilizados. En cambio, sí que existen estudios recientes en los que se ha caracterizado el contenido en lípidos de la membrana de algunas líneas celulares tumorales de cáncer de vejiga y de cáncer de mama en los que se observa que esta composición es característica de cada tipo celular ([8399],[8412]).

## **D. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA DE LOS ADENOCARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES**

Una vez caracterizada la membrana por su contenido en lípidos y proteínas, se analizaron los posibles cambios en dicho contenido debidos a los efectos de los lípidos de la dieta.

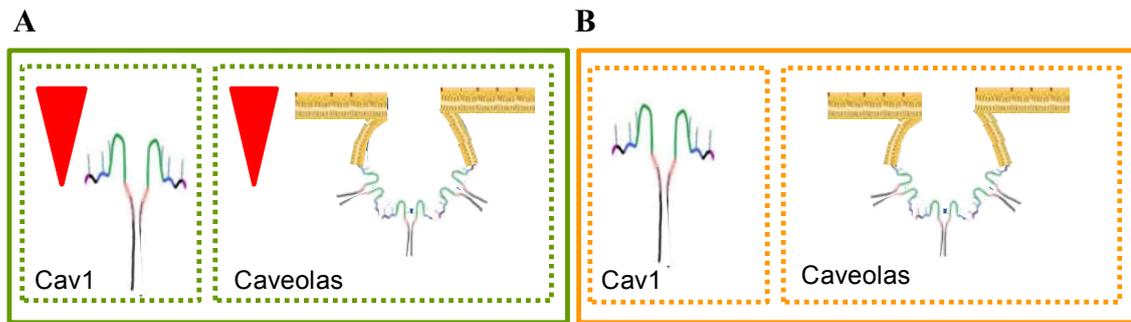
### **1. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN PROTEICA**

Los niveles de **Flot1** en LR no presentaron diferencias entre grupos. Dicho resultado podría ser debido a que esta proteína no es un buen marcador de cambios en este microdominio. Debido al papel de proteína formadora de LR que se le otorgó a Flot1 en un

principio ([8253]), muchos autores creen que sus niveles son un reflejo indirecto de la cantidad de LR que contiene la célula, pero recientemente se le han adjudicado funciones nuevas, sobretodo relacionadas con el reciclaje de receptores de membrana, como por ejemplo EGFR ([8248],[8251]). Cada vez hay más evidencias experimentales del papel que ejerce Flot1 en vías de señalización, como por ejemplo con el receptor de insulina o en la activación de células T ([8250]), e incluso se ha demostrado un papel relevante en la regulación de los receptores de la familia ErbB ([8262]). Aunque en el presente estudio no se han hallado diferencias entre grupos experimentales, algunos autores han descrito una correlación de Flot1 con el estado clínico y con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama ([8246]).

En cuanto a **Cav1**, los resultados mostraron que la dieta rica en aceite de oliva se asocia a una disminución de dicha proteína. Dado que Cav1 es esencial, aunque no es la única, para la formación de este subtipo de LR, este resultado sugeriría una menor formación de caveolas en las membranas de los tumores de este grupo (Figura 50) ([7797]). Tal y como se ha indicado el apartado E de la Introducción, las caveolas tienen un papel importante en endocitosis, transcitosis y transducción de señales ([8280]), por lo que las células que carezcan de estas estructuras morfológicas en sus membranas serían incapaces de desarrollar muchas de estas funciones consideradas importantes para la supervivencia celular. Por otro lado, la formación de caveolas no es la única función que desempeña Cav1. Abundantes estudios han demostrado su implicación en cáncer ([5447]). Así, Cav1 parece desempeñar un papel dual en la enfermedad cancerosa, de manera que en estadios iniciales, cuando la célula empieza a diferenciarse a célula tumoral, actuaría frenando dicha diferenciación e inhibiendo señales de proliferación, probablemente a través del CSD que mantiene inhibidas a un gran número de proteínas de señalización. Sin embargo, una vez la célula ya se ha transformado a célula tumoral, Cav1 promovería señales de progresión ([6357]). En el marco del presente estudio, en el que se han analizado tumores ya establecidos, Cav1 ejercería un papel promotor de la tumorigénesis, por lo que niveles bajos de dicha proteína podrían implicar menos señales mitogénicas y proliferativas en los adenocarcinomas mamarios. Esta hipótesis está de acuerdo con diversos estudios que demuestran que tumores de próstata y mama con ausencia de expresión de Cav1 tienen un mejor pronóstico que aquellos con dicha expresión ([8450],[8451]). La baja o nula expresión de Cav1 en células que forman parte del estroma del tumor también se ha descrito como un marcador de buen pronóstico debido a una disminución en la metástasis tumoral ([6219]). Así, los resultados de este trabajo indicarían

que la dieta rica en aceite de oliva virgen estaría promoviendo una pérdida o una disminución de los niveles de Cav1 en los adenocarcinomas mamarios, lo cual podría contribuir a frenar la proliferación celular una vez iniciada la progresión tumoral. Ello estaría de acuerdo con el efecto protector que mostró dicha dieta durante la promoción de la carcinogénesis mamaria.



**Figura 50: Efecto del aceite de oliva virgen extra (A) y del aceite de maíz (B) sobre el contenido en Cav1 y la formación de caveolas.** El aceite de oliva virgen extra provocaría una disminución o pérdida del contenido en Cav1 y, consecuentemente, una menor o nula formación de caveolas, mientras que el aceite de maíz no ejercería ningún efecto sobre los niveles de Cav1 ni sobre la formación de estos microdominios de membrana.

## 2. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA

### 2.1. Cambios en la composición de tipos de lípidos

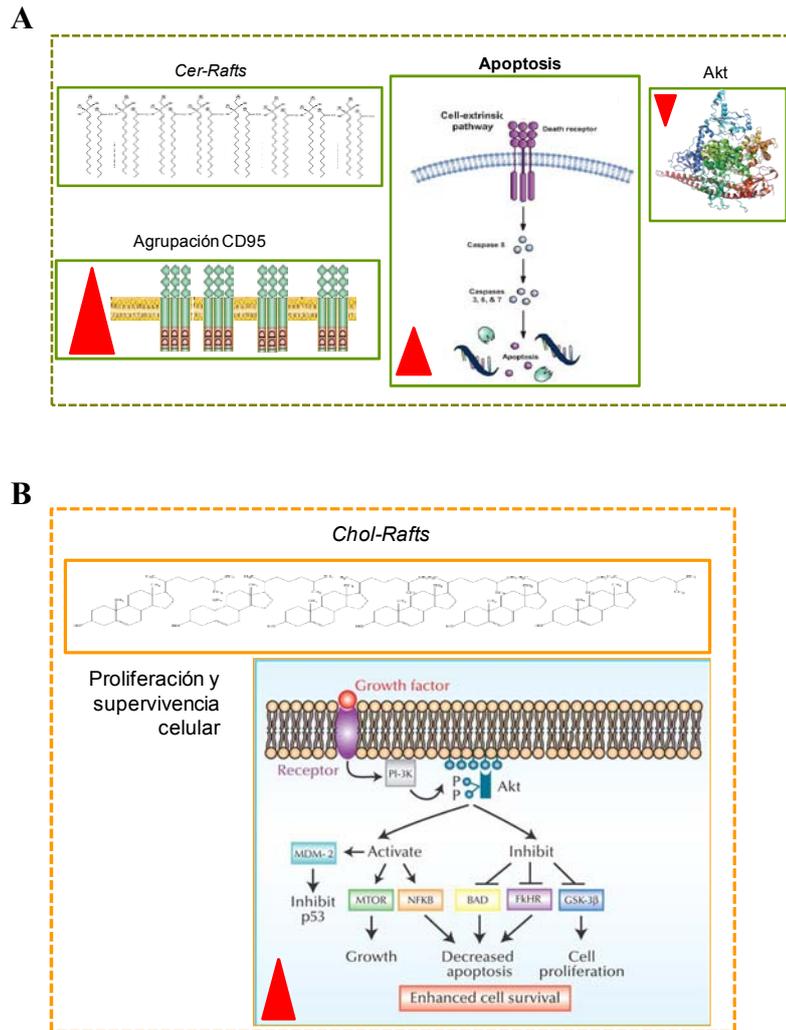
Los resultados de este trabajo mostraron que los lípidos de la dieta no modificarían sustancialmente el contenido de los distintos tipos de lípidos de la membrana a nivel de membrana total y membrana soluble. Así, en **membrana total** tan sólo se detectaron tendencias a la disminución en el contenido de Cer y PC en el grupo de la dieta de aceite de oliva. En **membrana soluble**, el único cambio significativo fue la disminución del contenido en Cer debido a la dieta de aceite de maíz, la cual también tendió a aumentar los niveles de Col. Cabe destacar que dicha disminución de Cer sería difícil de interpretar dado que, tal como ya se mencionó anteriormente, las moléculas de Cer en MS actuarían como entidades aisladas, sin formar plataformas apoptóticas ([7442]). En general, podría concluirse que la ausencia de grandes diferencias en el tipo de lípido tanto en membrana total como en membrana soluble podría estar indicando que el efecto de los lípidos de la dieta se realizaría fundamentalmente sobre determinados microdominios de la membrana, de manera que en el estudio de la membrana total y la MS dichas diferencias podrían haber quedado diluidas. En

este sentido, a pesar de que la TLC se considera un buen método para el estudio de la composición lipídica de las membranas, tales diferencias podrían quedar por debajo de su nivel de sensibilidad.

En cambio, el conjunto de resultados indicaría que es en *Lipid Rafts* donde los lípidos de la dieta parecen ejercer una mayor influencia a la hora de modificar el tipo de lípidos. Así, la dieta rica en aceite de maíz aumentó significativamente el contenido en Col y SM, mientras que la dieta de aceite de oliva produjo un aumento de Cer así como de la ratio Cer/SM. Se observaron, además, algunas tendencias en lípidos minoritarios, como el aumento de PI y PC en el grupo del aceite de maíz y la disminución de PE en el de aceite de oliva. Estos resultados sugieren, por una parte, que la dieta de aceite de maíz promovería la formación de *Chol-Rafts*. Dichas plataformas intervienen en la activación de vías de señalización de proliferación celular y se han hallado desreguladas en células transformadas, indicando su papel en la tumorigénesis ([6289],[8382],[8379]). En modelos de membrana se ha descrito que la SM es clave para la cohesión de zonas con características de LR ([8387]). Estudios realizados en células de cáncer de mama sensibles y resistentes a doxorubicina han demostrado que las células resistentes presentan un aumento de los niveles de Col y SM en comparación con las células sensibles, siendo precisamente esta característica la que estaría relacionada con su resistencia, ya que la menor fluidez propia de los LR dificultaría la entrada del fármaco a la célula tumoral ([8392]). Además, la tendencia al aumento de PI y PC debido a la dieta de aceite de maíz podría estar relacionada con el papel que estos fosfolípidos desempeñan en la promoción de la proliferación celular ([8392],[8412]). Estos resultados estarían de acuerdo con el efecto estimulador que dicha dieta ejerció sobre la carcinogénesis mamaria, tanto a nivel clínico como de características histopatológicas de los tumores. En este sentido, cabe destacar que los adenocarcinomas del grupo M fueron los que presentaron mayor número de mitosis. Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que la dieta rica en aceite de oliva se asociaría a una mayor formación de *Cer-Rafts*, en detrimento de los *Chol-Rafts*, en los tumores mamarios. El aumento de estas plataformas pro-apotóticas estaría de acuerdo con el efecto estimulador de la apoptosis de esta dieta que previamente demostró el grupo investigador ([6879]). El aumento de la formación de plataformas de Cer sugerido por los resultados de este trabajo indicaría que la inducción de la apoptosis por la dieta de aceite de oliva en los tumores mamarios podría producirse, al menos en parte, a través de la vía extrínseca, mediante receptores de muerte anclados a dichas plataformas. La tendencia al incremento de los niveles de la proteína CD95 detectada en membrana total en los tumores de

los animales alimentados con dicha dieta estaría de acuerdo con esta hipótesis. Resultaría de gran interés determinar en el futuro los niveles de este receptor de muerte en LR para poder confirmarla. Se ha descrito que las células tras sufrir un estímulo estresante activan los mecanismos necesarios para crear un mayor número de plataformas de Cer, lo cual conllevaría una mayor agrupación de receptores CD95 con la finalidad de promover la muerte celular por apoptosis ([8389]). Además, estudios recientes han demostrado que la formación de plataformas que promueven la apoptosis se asocia a una menor activación de la vía PI3K/Akt ([7431]), e interesantemente el grupo investigador demostró anteriormente que el efecto pro-apoptótico de la dieta rica en aceite de oliva virgen se asociaba a una *down-regulation* de la vía Akt ([6879]). Finalmente, la tendencia a la disminución de PE en LR por efecto de la dieta de aceite de oliva también apoyaría tales cambios en las plataformas de señalización celular, dado que se ha descrito que dicho fosfolípido juega un papel importante en el mantenimiento de la curvatura apropiada de la membrana y en la estabilización de proteínas para optimizar su conformación ([8446]). En la figura 51 se esquematizan los resultados y la hipótesis elaborada a partir de éstos.

El estudio de **caveolas** prácticamente no reveló diferencias por efecto de los lípidos de la dieta. Por tratarse de un subtipo de LR, cabía esperar que las caveolas presentaran un contenido lipídico similar al de éstos, pero con un enriquecimiento en ciertas proteínas, como Cav1. La ausencia de diferencias halladas en este trabajo en caveolas podría deberse a que se trata de una única fracción de la membrana, a diferencia de los LR, analizados a través de un *pool* de fracciones. Únicamente se halló una disminución de los niveles de PS asociada a la dieta de aceite de maíz. El hecho de que se trate de un lípido minoritario implica que esta diferencia debe ser considerada con precaución. Aún y así, resulta interesante destacar que PS se considera una señal iniciadora de la apoptosis para que la célula sea reconocida y eliminada por los fagocitos ([8445]).



**Figura 51: Efecto del aceite de oliva virgen extra (A) y del aceite de maíz (B) sobre la formación de diferentes tipos de Rafts y sobre las vías de señalización celular asociadas.** El aceite de oliva virgen extra promovería la formación de *Cer-Rafts* y, consecuentemente, una mayor agrupación de la proteína CD95, asociada a una mayor apoptosis y a una disminución de la vía de supervivencia PI3K/Akt. El aceite de maíz, en cambio, promovería una mayor formación de *Chol-Rafts*, lo cual se asociaría a una estimulación de vías de proliferación en las células tumorales.

Finalmente, cabe mencionar las diferencias halladas en el contenido en TAG por efecto de los lípidos de la dieta. Tal como se ha discutido en el apartado de caracterización de los dominios de membrana de los tumores mamarios experimentales, los inesperados elevados niveles de TAG detectados en este trabajo podrían estar relacionados con la formación de LD en las células tumorales, y no estrictamente con cambios en la composición de la membrana. Sin embargo, el hecho de que dichos niveles estuvieran aumentados en el grupo de dieta de aceite de maíz, tanto en MS como en LR, resultó de interés. Además, previamente se había descrito un aumento del llamado fenotipo secretor en los tumores de este grupo, haciendo referencia al aumento de gotitas lipídicas en el citoplasma celular en comparación a los otros

grupos (datos no mostrados). Estos hallazgos permiten hipotetizar que el aumento de LD por efecto de la dieta de aceite de maíz podría estar relacionado con el efecto estimulador de este tipo de dietas, ricas en PUFA n-6, en cáncer de mama experimental. En este sentido, numerosos estudios han puesto de manifiesto que un mayor contenido en estas gotitas lipídicas se asocia a un aumento de la malignidad y supervivencia en células tumorales frente al estrés ([8393]). Esta interesante hipótesis deberá ser contrastada en el futuro.

## **2.2. Cambios en la composición de ácidos grasos**

A diferencia de lo ocurrido con el tipo de lípidos presentes en la membrana, los lípidos de la dieta modificaron el contenido en ácidos grasos tanto de membrana total como de membrana soluble en los adenocarcinomas mamarios experimentales.

La dieta rica en aceite de maíz se asoció a un aumento en el contenido total de PUFA y a una disminución en el de MUFA y no modificó los niveles de SFA en **membrana total**. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva aumentó los niveles totales de MUFA, disminuyó los de SFA y no modificó los niveles de PUFA. Cabe destacar que los niveles del ácido palmítico (C16:0), el SFA mayoritario, disminuyeron con las dos dietas hiperlipídicas, pero tal y como muestran los resultados de la caracterización de la membrana de las células tumorales, en el grupo alimentado con aceite de maíz éste siguió siendo el ácido graso mayoritario de la membrana. En cambio, en el grupo de aceite de oliva el ácido palmítico pasó a ser el segundo ácido graso más abundante en la membrana, por detrás del ácido oleico, indicando así una mayor disminución de ácido palmítico en este grupo. Además, mientras la dieta de aceite de maíz disminuyó también algunos SFA minoritarios, como el ácido mirístico y el margárico, la dieta de aceite de oliva ejerció sus efectos sobre los ácidos grasos mayoritarios (ácidos palmítico y esteárico). Por otra parte, la mayoría de MUFA analizados disminuyeron por efecto de la dieta rica en aceite de maíz, a excepción del ácido eicosenoico (C20:1 n-9) que no se modificó. En cambio, la dieta de aceite de oliva aumentó los niveles de ácido oleico, hasta el punto de coronarse como ácido graso mayoritario de las membranas de los tumores de este grupo, así como los de palmitoleico (C18:1). En cuanto a los PUFA, la dieta rica en aceite de maíz aumentó la mayoría de ellos, especialmente el ácido linoleico, mientras la dieta de aceite de oliva no los modificó.

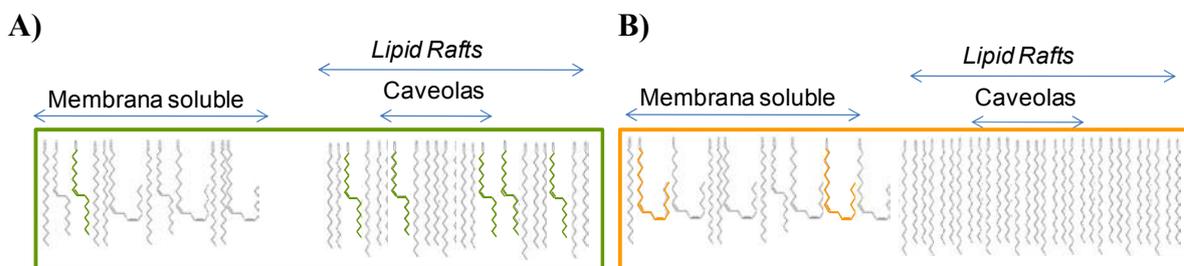
En **membrana soluble** las dos dietas hiperlipídicas produjeron efectos similares en cuanto a contenido total en SFA, MUFA y PUFA. Así, no modificaron los niveles totales de

SFA, disminuyeron los de MUFA y aumentaron los de PUFA. De la misma forma, ambas dietas disminuyeron, igual que en membrana total, los niveles de ácido palmítico. Sin embargo, nuevamente la dieta de aceite de oliva fue la que mostró la mayor disminución de este ácido graso, de manera que en MS el ácido palmítico pasó a ser el tercer ácido graso más abundante, por detrás del araquidónico y del oleico, mientras que en el grupo del aceite de maíz se mantuvo en segundo lugar, igual que en el control, por detrás del araquidónico. En cuanto a los MUFA, las dos dietas experimentales se asociaron a una disminución en los niveles de ácido oleico, sobre todo la dieta de aceite de maíz. En cambio, los PUFA aumentaron de manera generalizada con la dieta de aceite de maíz, mientras que con la dieta rica en aceite de oliva solamente se hallaron mayores niveles de los ácidos linoleico y araquidónico.

Los resultados obtenidos sugieren que el efecto modulador diferencial de las dietas ricas en aceite de maíz y aceite de oliva virgen se ejerce, al menos, en parte, mediante la incorporación de sus ácidos grasos mayoritarios en la membrana, modificando así la composición de ésta. Mientras la dieta de aceite de oliva provoca un enriquecimiento de la membrana de las células tumorales en MUFA y especialmente en ácido oleico, la dieta rica en PUFA n-6 la enriquece en este tipo de ácidos grasos, sobre todo en ácido linoleico. Este hecho también se demuestra en el aumento de la ratio ácido linoleico:ácido oleico asociado a la dieta de aceite de maíz. Este mismo tipo de mecanismo de acción ha sido descrito por otros autores para explicar los efectos protectores de los PUFA n-3 en diversos cánceres, en comparación con los PUFA n-6 ([6339]). Sin embargo, con la información disponible, no se han encontrado trabajos en la literatura internacional que demuestren este tipo de cambios para el aceite de oliva. La incorporación de ácidos grasos procedentes de la dieta a la membrana celular modificaría las características estructurales y de fluidez de ésta, además de crear una segregación espacial tanto en lípidos como en proteínas. Se ha descrito que las cadenas de ácidos grasos que forman la membrana plasmática son fundamentales para mantener íntegra su estructura, así como la fluidez y el correcto funcionamiento de ésta ([7424],[8401]). Asimismo, los ácidos grasos incorporados exógenamente por parte de la célula modifican las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana ([8391]). De esta manera, los cambios en la fluidez de la membrana provocados por los aceites de maíz y de oliva podrían inducir modificaciones en la difusión de las proteínas que se hallan en cada uno de los diferentes dominios de membrana, llegando así a alterar el contenido proteico de ésta. Como resultado de estos cambios, se producirían modificaciones esenciales para la

funcionalidad de la célula. Así, por ejemplo, tal y como se ha citado anteriormente, la mayor incorporación de ácido oleico a la membrana debida a la dieta de aceite de oliva podría llegar a suprimir la actividad  $\Delta 6$ -desaturasa, hecho que estaría de acuerdo con la menor progresión de los tumores del grupo alimentado con esta dieta, puesto que ello conllevaría una menor formación de eicosanoides derivados del ácido linoleico, caracterizados por su efecto proinflamatorio y asociados a un aumento del crecimiento tumoral y metástasis ([3421]).

Por otra parte, los resultados de este trabajo sugieren que los lípidos de la dieta no sólo modifican la composición de la membrana, sino que, además, lo hacen de forma específica y selectiva, mediante la incorporación de determinados ácidos grasos en diferentes dominios de la membrana. Así, el enriquecimiento de la membrana en ácido linoleico causado por la dieta de aceite de maíz se vio reflejado en MS, mientras que el enriquecimiento en ácido oleico asociado a la dieta de aceite de oliva no se tradujo en ese mismo cambio a nivel de MS. Ello sugeriría que dicho ácido oleico se habría incorporado en otros dominios de la membrana distintos a la MS, como por ejemplo LR. Paralelamente, la dieta de aceite de oliva provocó una disminución de SFA en membrana total pero no en MS, lo que nuevamente sugiere que la disminución de estos ácidos grasos podría suceder en LR. Por tanto, ambas dietas parecen modificar la composición en ácidos grasos de la membrana actuando sobre distintos dominios. Los resultados sugieren que la dieta de aceite de maíz, rica en PUFA n-6, actuaría a nivel de MS, mientras que la dieta de aceite de oliva, rica en MUFA n-9, podría modificar la composición en ácidos grasos de microdominios tipo LR (Figura 52). Otros autores han demostrado en cáncer de colon que los PUFA n-3 de la dieta, con efectos inhibidores del crecimiento tumoral, se incorporan en las membranas a nivel de LR, a diferencia de los PUFA n-6 que lo hacen en el resto de membrana o en dominios *non-Lipid Raft* ([3920],[6338],[7339],[8217]).



**Figura 52: Incorporación de MUFA n-9 y PUFA n-6 por efecto del aceite de oliva virgen extra (A) y del aceite de maíz (B), respectivamente, en diferentes dominios de la membrana.** Los MUFA n-9 del aceite de oliva virgen extra se incorporarían mayoritariamente en LR, mientras que los PUFA n-6 del aceite de maíz lo harían fundamentalmente en MS.

El efecto diferencial de los lípidos de la dieta sobre los diferentes dominios de la membrana tendrá, sin duda, distintas consecuencias para las células tumorales. En este sentido, la disminución del contenido de Cav1 en LR por efecto de la dieta de aceite de oliva observada en este trabajo podría ser una de las consecuencias inmediatas del enriquecimiento de estos microdominios en ácido oleico y la consecuente disminución en SFA, en concreto de ácido palmítico. Es bien conocido que Cav1 requiere un ambiente rico en SFA para poder anclarse a LR. En concreto, debe sufrir una modificación postraduccional que implica su palmitoilación en el dominio C-ter de la proteína ([5734],[7593]). Cambios en el ambiente lipídico de LR dificultarán dicha modificación y, por tanto, la localización de Cav1 en este microdominio, así como su función. Por otra parte, resultados previos del grupo investigador también demostraron que la dieta de aceite de oliva disminuía la actividad de la proteína p21Ras y modificaba la vía de señalización mediada por Akt ([6879]). p21Ras es una importante proteína transductora de señales que debe sufrir palmitoilación, entre otros cambios post-traduccionales, para su activación (ref??). Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo también apoyarían que dicha disminución de la actividad de p21Ras podría deberse a cambios en la composición en ácidos grasos en determinados dominios de la membrana de las células tumorales. Dichos cambios también podrían afectar a los activadores de la propia p21Ras, como GAP (*GTPase activating protein*), que también interaccionan con LR ([4307]), de manera que éstos podrían ser incapaces de llevar a cabo su función de activar dicha proteína. Estudios realizados con PUFA n-3 en cáncer de colon han demostrado translocación de proteínas residentes en caveolas, como óxido nítrico sintasa o EGFR, tras la modificación de la composición en ácidos grasos de dichos microdominios ([5453],[7155],[7156],[7374]). Seo et. al también han descrito que los PUFA n-3 pueden modular el *trafficking* de proteínas lipidadas que se dirigen a la membrana mediante cambios en la composición de ésta ([5437]).

Las consecuencias de los cambios en la composición en ácidos grasos de la membrana vendrían dados, en parte, por la estructura de sus cadenas, como han demostrado diferentes estudios ([6297],[6298]). Así, los impedimentos estéricos entre las cadenas alquílicas conllevan una segregación lateral en dominios de membrana con composiciones en lípidos y proteínas características. Los LR son microdominios de membrana importantes para la célula, por lo que es previsible que su composición esté estrechamente regulada por la célula para evitar que se modifique ([5447],[5448],[6290]). Este hecho, juntamente con la riqueza en SFA de los LR, explicaría que la incorporación de cadenas poliinsaturadas creara una

desestructuración de estas balsas lipídicas, de manera que este tipo de ácidos grasos serían más fácilmente incorporados por la célula en dominios con una composición más variable y menos conservada, como la MS. Asimismo, tal y como se ha mencionado anteriormente, el cambio en la composición en ácidos grasos de la membrana y sus dominios, comportaría un cambio de fluidez y de función en la célula. De este modo, los microdominios LR, por su riqueza en SFA son zonas con poca fluidez en comparación con MS ([5198]). La incorporación de los MUFA en estos microdominios distorsionaría el gran empaquetamiento que existe entre las cadenas hidrocarbonadas, provocando así un aumento de fluidez. En cambio, la incorporación de PUFA en MS no conllevaría, en principio, cambios tan drásticos en la fluidez de membrana. Existen estudios en modelos de membrana que ponen de manifiesto el cambio en la fluidez y la estructura de LR al incorporar ácidos grasos insaturados ([7799]). Este podría ser uno de los mecanismos por los que el aceite de oliva ejerciera cierta lipotoxicidad sobre la célula tumoral, mediante la desestabilización de LR. Dicho efecto sería perjudicial para la célula tumoral pero beneficioso para el organismo huésped. Sin duda, el análisis de ácidos grasos en LR debería ser realizado en el futuro para contrastar las hipótesis.

Los cambios en la composición en ácidos grasos que modifican el ambiente de la membrana podrían haber tenido su efecto no solamente en la composición de proteínas, sino también de los lípidos estructurales de la membrana. Existen estudios que demuestran que dichos lípidos tienen afinidad por ciertos ácidos grasos presentes en la bicapa y que debido al enriquecimiento diferencial en ácidos grasos en los distintos dominios de membrana, los lípidos tienden a segregarse, participando de esta forma en la formación de dichos dominios ([7799]). Así, las moléculas de Col y SM tendrían preferencia por las cadenas de ácidos grasos saturadas ([6298]), motivo por el que los microdominios LR estarían enriquecidos en estos dos lípidos. Además las moléculas de Col, por su función de "relleno" de los huecos existentes entre las colas de ácidos grasos, contribuirían al empaquetamiento y cohesión de LR ([5198]). Los resultados de este trabajo no muestran grandes modificaciones en la composición de lípidos estructurales de la membrana, pero sí apuntan ciertos cambios, sobretudo en LR. Cabe destacar que otros autores han descrito cambios de ácidos grasos de membrana en células de cáncer de mama cuando son sometidas a ciertos tratamientos sin que se produzcan modificaciones en los diferentes tipos de lípidos ([8407]). En este trabajo el aumento de Col observado en LR debido a la dieta rica en aceite de maíz podría ser una consecuencia del desplazamiento de las moléculas de Col desde la MS provocado por el

enriquecimiento en PUFA que produce dicha dieta, dado que éste haría que las moléculas de Col perdieran afinidad por este dominio de membrana. Dichas moléculas se podrían redistribuir por la membrana, formándose mayores depósitos de este lípido en LR, lo cual favorecería ciertas vías de transducción de señales asociadas a proliferación o supervivencia celular, como la vía Akt, ya que se ha demostrado que la activación de dicha proteína en LR requiere de adecuados niveles de Col en este tipo de microdominios ([7505]). Así, en células de cáncer de próstata el enriquecimiento en Col en LR promovió una mayor activación de la vía Akt y, consecuentemente, mayor supervivencia de las células tumorales ([5453]). Asimismo, en células HeLa se ha demostrado que la incorporación de PUFA en la membrana celular altera el tamaño y la distribución de los dominios de membrana ([6043]). Otros estudios han mostrado que las moléculas de Col pierden afinidad por ciertas zonas de la membrana que se hallan modificadas por los lípidos de la dieta ([7155],[7156]). También se ha descrito que la incorporación de PUFA en la membrana segrega dos tipos de dominios en ésta, por un lado los dominios ricos en PUFA y pobres en Col y, por otro lado, los pobres en PUFA y ricos en Col ([5198]).

Por otra parte, la incorporación de MUFA en LR debido a la dieta de aceite de oliva no pareció ejercer cambios en la cantidad de Col de estos microdominios. Sin embargo, la mayor ratio Cer/SM asociada a esta dieta sugiere que el enriquecimiento en MUFA en los LR de los adenocarcinomas mamarios de algún modo habría constituido un estímulo para modificar los *Chol-Rafts* por plataformas de Cer. Además de desplazar las moléculas de Col, Cer también desplazaría proteínas de unión a éste, como sería el caso de Cav1, lo cual también está de acuerdo con la disminución de dicha proteína en los LR de los tumores del grupo de aceite de oliva. El posible desplazamiento de Col por parte de Cer cuando ésta pasa a formar parte de LR ha sido previamente reportado ([8390]), al igual que el desplazamiento de proteínas residentes en LR, como Cav1 ([7425],[7434]). Las distintas características bioquímicas de PUFA i MUFA explicarían la segregación de estos ácidos grasos en diferentes dominios de la membrana, formando así plataformas diferenciadas tanto por su composición como por su función. Así, tales microdominios pasarían de ejercer un papel estimulador de la carcinogénesis a un papel inhibidor, ya que se enriquecerían en moléculas pro-apoptóticas. Diversos trabajos han descrito que un leve estímulo puede activar la formación de *Cer-Rafts* y provocar un aumento de la vía apoptótica extrínseca ([7433],[7439],[7443]). Existen numerosos estudios, fundamentalmente realizados con PUFA n-3, que demuestran que estos lípidos de la dieta pueden modificar la funcionalidad celular y dirigir a la célula hacia la

apoptosis ([8223]). Todo ello apoya la hipótesis de que la inducción de la apoptosis en los tumores mamarios por efecto de la dieta rica en aceite de oliva, demostrada previamente por el grupo investigador ([6879]), podría deberse, al menos en parte, a los cambios que esta dieta induciría en la composición lipídica de la membrana. El leve aumento de la expresión de receptores apoptóticos CD95 observado en este trabajo va en este mismo sentido. El aumento de la formación de Cer y de la localización de CD95 en LR se ha asociado a una disminución en la activación de Akt ([7431],[7505],[7506]), resultado también obtenido previamente, tal como ya se citó. Gajate *et al.* han demostrado que Edelfosina, una molécula de origen lipídico con potencial actividad antitumoral, se incorpora en la bicapa lipídica modificando su composición y estructura y creando plataformas de Cer que desencadenan una señal por parte de CD95, independientemente de su ligando (CD95L) ([8267]). CD95 podría tener además implicación en el inicio de la necrosis celular, actuando a través de una vía de señalización no apoptótica ([8382]). Diversos compuestos dietéticos parecen actuar sobre la vía extrínseca de la apoptosis, a través de CD95. Recientemente se ha postulado que catequinas, isoflavonas y resveratrol podrían ejercer un papel preventivo en el tratamiento del cáncer de próstata a través de la estimulación de la vía apoptótica iniciada por CD95 ([7502]). Otros estudios recientes demuestran que la ingestión de ciertos tipos de lípidos, concretamente PUFA n-3, durante tratamientos con quimioterapia mejoran la respuesta al tratamiento debido a su incorporación a membrana, la modificación en la composición y estructura de LR, y el consecuente cambio en vías de señalización asociadas ([6016],[8238],[8239],[8267]).

### **3. ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES**

Para profundizar en el significado de los resultados obtenidos e integrarlos, se decidió correlacionar los diferentes parámetros clínicos, bioquímicos y moleculares estudiados a lo largo del trabajo. De las 38 correlaciones lógicas que se establecieron en el presente trabajo, aproximadamente el 46% de ellas resultaron estadísticamente significativas en la dieta rica en aceite de oliva.

En primer lugar, cabe destacar las asociaciones entre parámetros relacionados con la formación de los diferentes tipos de *Rafts*. Ambas dietas hiperlipídicas mostraron una correlación positiva entre los lípidos formadores de *Chol-Rafts*, Col y SM, y el lípido formador de *Cer-Rafts*, Cer. Dicha correlación también se halló en el grupo de dieta

normolipídica, pudiendo asociarse así a una característica propia de la enfermedad cancerosa y no al efecto de la dieta. Mientras que la dieta de aceite de maíz no mostró ninguna otra correlación, el aceite de oliva mostró correlaciones positivas entre los niveles de lípidos formadores de *Chol-Rafts* y Cav1, así como entre los niveles de SFA y Col, y entre los niveles de SFA y Cav1. Dicha dieta también presentó correlaciones negativas entre los niveles de MUFA y Col, y entre los niveles de MUFA y Cav1. Estas asociaciones están de acuerdo con los resultados hallados en el presente trabajo en los que la dieta rica en aceite de oliva enriqueció la membrana en MUFA en detrimento de los SFA y de este modo produciría una disminución tanto en la formación de *Chol-Rafts* como en los niveles de Cav1. A pesar de ello, no se halló ninguna correlación entre la formación de *Cer-Rafts*, representada por la ratio Cer/SM, y los niveles de Cav1, ni entre la formación de estos *Rafts* y alguno de los tipos de ácidos grasos estudiados.

También se analizaron las posibles correlaciones entre los niveles de la proteína proapoptótica CD95 y los demás parámetros estudiados. En este caso, cabe destacar que los niveles de CD95 no correlacionaron con los niveles de formación de *Cer-Rafts* y que solamente se halló una correlación negativa entre los niveles de CD95 y SFA, y CD95 y PUFA asociada a la dieta rica en aceite de maíz, hecho inesperado a la vista de los resultados obtenidos anteriormente. Sin descartar otras posibles causas, la falta de asociación de CD95 con otros parámetros e incluso la falta de sentido en las asociaciones halladas podría deberse a que el análisis de los niveles de CD95 no pudo realizarse en LR sino en membrana total debido a cuestiones metodológicas.

Seguidamente se asoció el grado de malignidad tumoral con diferentes parámetros bioquímicos y moleculares. En este caso, la dieta rica en aceite de oliva mostró correlaciones positivas entre el grado en la escala SBR11 y los niveles de Cav1, y entre dicho grado y los niveles de SFA. Asimismo, se halló una asociación negativa con dicha dieta entre el grado de malignidad tumoral y los niveles de MUFA. Dichas asociaciones, como ya ha sucedido anteriormente, están de acuerdo con los resultados hallados en el presente trabajo, en los que se pone de manifiesto que la dieta rica en aceite de oliva ejercería, al menos en parte, sus efectos moduladores protectores sobre la carcinogénesis mamaria experimental enriqueciendo la membrana en MUFA y disminuyendo los niveles tanto de SFA como de Cav1.

Finalmente, se analizó la posible correlación entre el grado de activación de p21Ras y los diferentes parámetros analizados en el presente trabajo. Ninguna de las correlaciones

obtenidas estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos previamente. Este hecho podría ser debido al tipo de metodología que se empleó para determinar la actividad de p21Ras ([6789]).

## **E. 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 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 extra, que además contiene multitud de compuestos minoritarios, es más controvertido. A pesar de que existen abundantes evidencias epidemiológicas y experimentales de su potencial efecto protector y quimiopreventivo, existen también resultados discordantes en la literatura, habiéndose descrito desde la falta de efecto hasta un efecto débilmente estimulador. Estudios anteriores del grupo investigador asociaron el efecto protector de las dietas ricas en aceite de oliva virgen con la disminución de la actividad de p21Ras, la *down-regulation* de la vía mediada por Akt y el aumento de la muerte celular por apoptosis. En cambio, el aceite de maíz no ejerció ningún efecto a este nivel, sugiriendo que los distintos tipos de lípidos de la dieta actuarían sobre vías diferentes para ejercer sus efectos moduladores diferenciales en el cáncer de mama ([6789]). Los cambios producidos en algunas de las vías de señalización celular podrían ser debidos a alteraciones en las plataformas de anclaje de la membrana de algunas de las proteínas implicadas en dichas vías. Estas plataformas, conocidas como LR, son sensibles al efecto de diferentes lípidos administrados tanto *in vivo* como *in vitro*, de manera que su composición puede verse afectada causando un cambio tanto estructural como funcional. En el presente trabajo se han obtenido datos a favor de que los lípidos de la dieta podrían actuar mediante este mecanismo al modificar la composición en ácidos grasos de determinados dominios de la membrana, lo cual se asociaría a modificaciones estructurales y funcionales de las proteínas y lípidos de dichos dominios.

En primer lugar, y en relación al análisis de la evolución ponderal de los animales del estudio, cabe destacar que el crecimiento homogéneo en los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo reflejó la idoneidad de las tres dietas experimentales para producir el crecimiento normal de dichos animales. En segundo lugar, el estudio de la histopatología

tumoral mamaria indicó que los tumores del grupo alimentado con la dieta rica en aceite de maíz presentaban características de mayor agresividad, como mayor grado arquitectural y nuclear, aumento de la actividad mitótica y mayor número de efectivos de alto grado, a diferencia del grupo de dieta de aceite de oliva virgen donde dichos parámetros, excepto la actividad mitótica, presentaron los valores más bajos. En cuanto al análisis de los parámetros de la carcinogénesis, la dieta rica en aceite de maíz ejerció un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria experimental que se manifestó en un comportamiento clínico más maligno de los adenocarcinomas (menor tiempo de latencia, mayores incidencia, contenido y volumen tumorales), mientras que la dieta rica en aceite de oliva se asoció a un efecto protector puesto que el tiempo de latencia y la incidencia fueron similares a los del grupo control, y el contenido y el volumen tumorales menores incluso que los de este grupo.

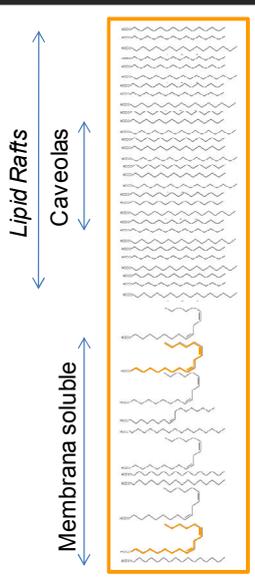
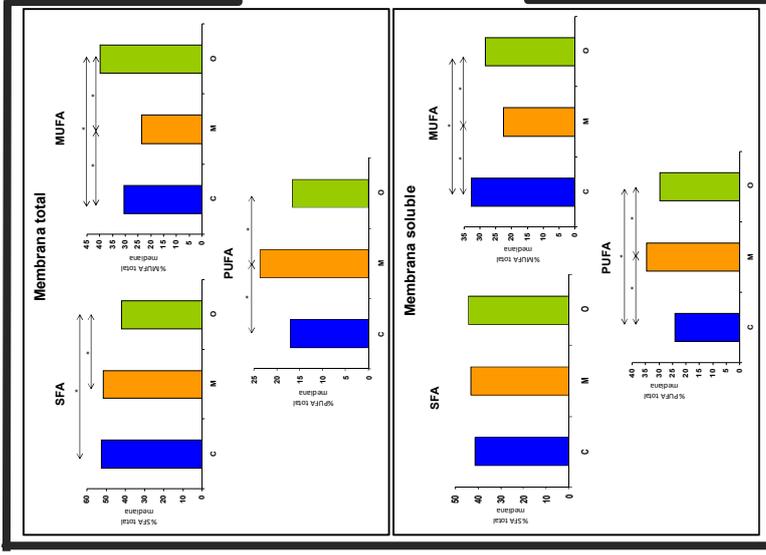
Para poder abordar el estudio de los posibles cambios en los dominios de membrana celular por efecto de los lípidos de la dieta y dada la falta de métodos validados en tejidos de rata publicados, hubo que estandarizar y validar un método que permitiera aislar DRMs en adenocarcinomas mamarios. A continuación, se caracterizó el perfil lipídico de la membrana y sus dominios de las células tumorales mamarias, tanto en tipo de lípidos como de ácidos grasos. Los resultados de dicha caracterización mostraron que la membrana celular de los tumores mamarios experimentales presentaba un alto contenido en Col y Cer, y un bajo contenido en fosfolípidos. Dicho enriquecimiento en Cer y Col podría ser un reflejo del balance proliferación-apoptosis propio de las células tumorales, ya que el elevado contenido en Col indicaría una elevada presencia de *Chol-Rafts*, implicados en vías de proliferación celular ([6289],[8382]), y la riqueza en Cer indicaría la formación de *Cer-Rafts*, asociados a apoptosis ([8390]). Por otro lado, se observó que los ácidos grasos mayoritarios en las membranas de las células tumorales mamarias fueron SFA, seguidos de MUFA y, finalmente, PUFA.

Los lípidos de la dieta modificaron la composición de la membrana a distintos niveles. Así, las dietas ricas en aceite de oliva y aceite de maíz enriquecieron la membrana celular en ácido oleico y linoleico, respectivamente, a expensas de disminuir los niveles de ácido palmítico, sobretodo en el caso de la dieta de aceite de oliva virgen. Además, estos cambios en la membrana se produjeron de forma específica y selectiva mediante la incorporación de dichos ácidos grasos en diferentes dominios de la membrana. Los resultados obtenidos sugieren que la dieta rica en aceite de maíz modificaría fundamentalmente la composición en

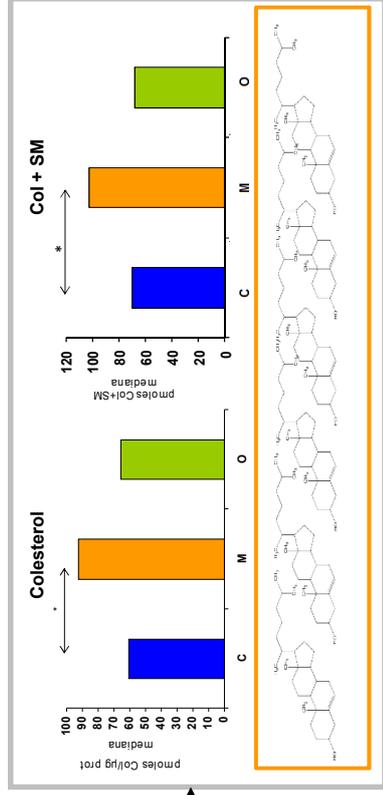
ácidos grasos de la MS (Figura 53). Ello provocaría la movilización del Col presente en este dominio hacia LR, de manera que la formación de *Chol-Rafts* se vería aumentada y, consecuentemente, también podrían estimularse vías de señalización intracelular asociadas a proliferación y supervivencia, como la vía Akt. Cabe destacar que los resultados también sugirieron que dicha dieta también promovería una mayor formación de LD, lo cual podría constituir una ventaja para la célula tumoral en términos de supervivencia celular. Todos estos cambios estuvieron asociados a una mayor malignidad, clínica e histopatológica, de los tumores mamarios, lo que permite suponer que el efecto promotor de la dieta rica en aceite de maíz en la carcinogénesis mamaria experimental podría haberse efectuado, al menos en parte, mediante los cambios producidos en la composición de la membrana. En cambio, los resultados obtenidos sugieren que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra modificaría el contenido en ácidos grasos de los microdominios LR (Figura 54). El enriquecimiento en ácido oleico y la disminución en ácido palmítico en LR impediría o dificultaría la presencia de proteínas, tanto estructurales como asociadas a vías de señalización, que requieren un determinado ambiente lipídico para anclarse y/o ser funcionales. Éste sería el caso de las proteínas Cav1 y p21Ras. La pérdida de Cav1 se asociaría a una menor formación de caveolas. Además, la diferente composición en ácidos grasos también habría desencadenado cambios en la composición de lípidos estructurales de estos microdominios. En este sentido, los resultados apuntan a un aumento en la conversión de SM a Cer lo cual podría propiciar la formación de *Cer-Rafts* en detrimento de los *Chol-Rafts*. Dicho cambio conduciría a la estimulación de la apoptosis por la vía extrínseca mediada por CD95, como sugiere la tendencia a los mayores niveles de esta proteína en la membrana de los tumores del grupo de aceite de oliva. Las asociaciones halladas entre algunos de los parámetros analizados apoyan estos resultados. Todos estos cambios bioquímicos y moleculares se asociaron a un fenotipo tumoral de menor malignidad, lo cual permite hipotetizar que el efecto potencialmente protector de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra en la carcinogénesis mamaria experimental podría haberse realizado, al menos en parte, mediante tales cambios en la composición, estructura y función de la membrana celular.



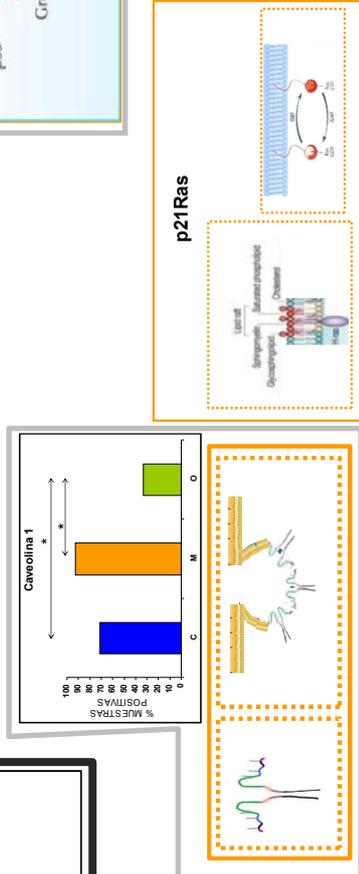
**A) Cambios en la composición en ácidos grasos**



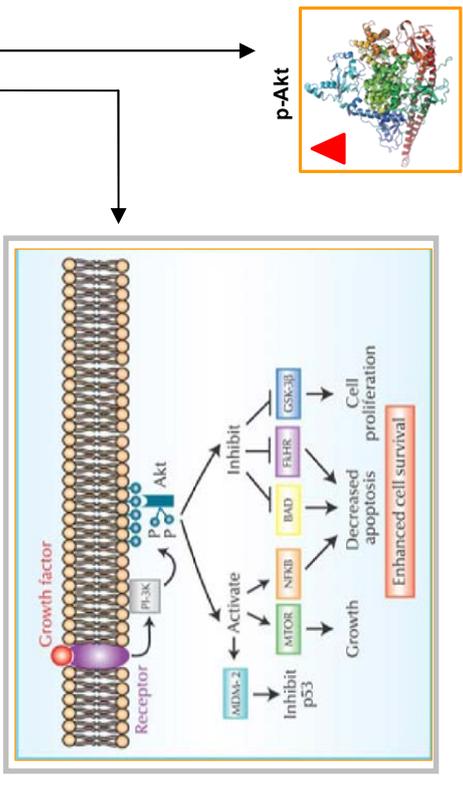
**B) Formación de Chol-Rafts**



**D) Contenido en proteínas palmitoiladas**



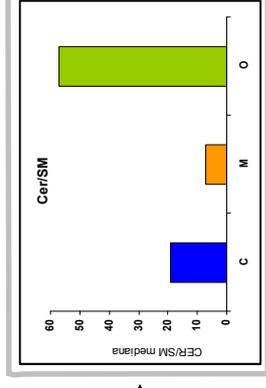
**C) Vías de proliferación y supervivencia celular**



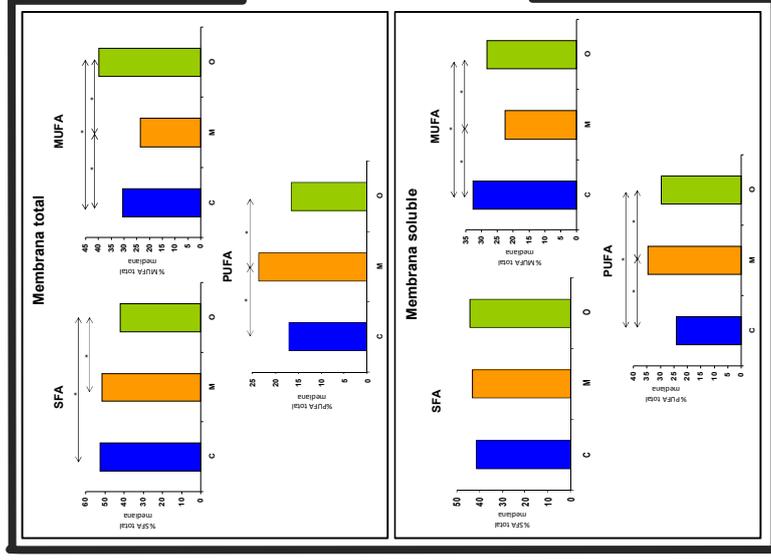
**Figura 53: Mecanismo de acción postulado para la dieta rica en aceite de maíz.** La incorporación de PUFA n-6, fundamentalmente ácido linoleico, en MS provocaría un cambio en el ambiente lipídico de este dominio de membrana (A) que induciría una redistribución de Col hacia LR, aumentando así el contenido de este lípido en estos dominios y, por lo tanto, promoviendo un aumento de la formación de *Chol-Rafts* (B), asociado a una mayor actividad de vías de proliferación y supervivencia celular, como la vía Akt (C). Los niveles de proteínas palmitoiladas, como Cav1 y p21Ras activa, no se modificaron (D).



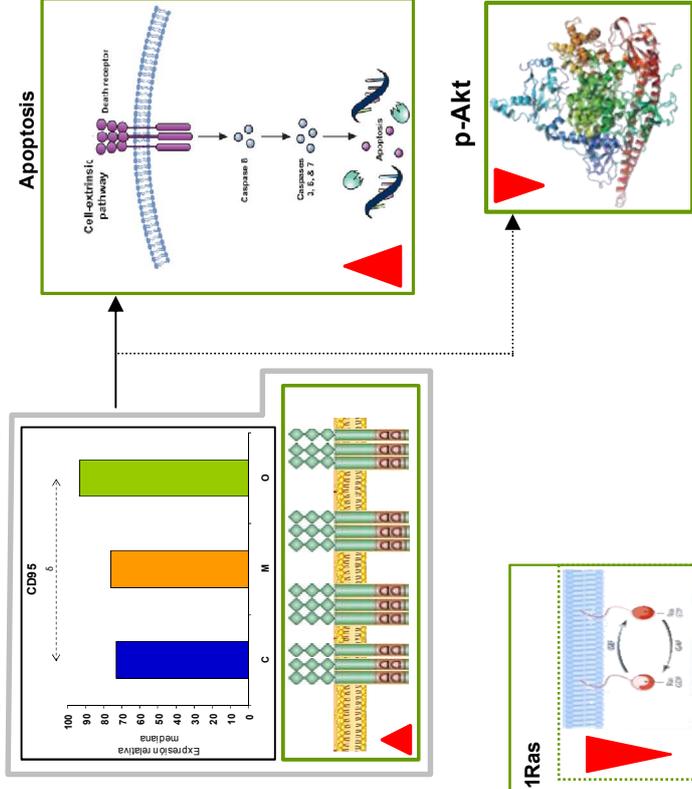
**B) Formación de Cer-Rafts**



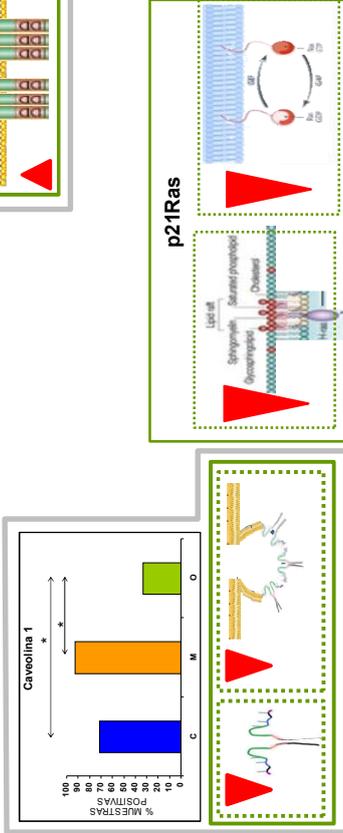
**A) Cambios en la composición en ácidos grasos**



**C) Agrupación de CD95 y apoptosis**



**D) Contenido en proteínas palmitoiladas**



**Figura 54: Mecanismo de acción postulado para la dieta rica en aceite de oliva virgen extra.** La incorporación de MUFA n-9, fundamentalmente ácido oleico, en LR provocaría un cambio en el ambiente lipídico de este microdominio de membrana (A) que induciría, por un lado, un aumento de la formación de Cer-Rafts (B), asociado a un aumento de la actividad pro-apoptótica a partir de la agrupación de receptores CD95 en estos microdominios y a una disminución de la activación de Akt (C), y, por otro, una disminución del contenido de las proteínas palmitoiladas Cav1 y p21Ras en LR, lo que conllevaría una disminución en la formación de caveolas y una disminución en la actividad de p21Ras, respectivamente (D).



---

Introducción

Material y métodos

Resultados

Discusión

**Conclusiones**

Bibliografía



**1. Del estudio del efecto de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal:**

1.1. Las dietas experimentales normal e hiperlipídicas fueron idóneas para el crecimiento normal de la rata Sprague-Dawley, a partir de la normalidad y la baja variabilidad entre individuos en la evolución ponderal, y la ausencia de patologías por desequilibrios nutricionales.

**2. Del estudio del efecto de los lípidos de la dieta sobre la histopatología mamaria:**

2.1. El tipo de patología que desarrollaron los animales del estudio fueron afecciones mamarias, y en su mayor parte tumores malignos, concretamente adenocarcinomas.

2.2. Los tumores del grupo alimentado con dieta rica en aceite de maíz fueron los que presentaron unas características morfológicas de mayor agresividad: mayor grado arquitectural y nuclear, aumento de la actividad mitótica, mayor porcentaje de tumores de alto grado en la escala SBR11, y mayor grado de necrosis e infiltrado inflamatorio.

2.3. Los tumores del grupo alimentado con dieta rica en aceite de oliva virgen extra fueron los que presentaron características de menor grado de malignidad, similares a los tumores del grupo control (bajo grado arquitectural y nuclear, y bajo grado en la escala SBR11), excepto el número de mitosis que fue intermedio entre este grupo y el de dieta de aceite de maíz.

**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. La dieta rica en aceite de maíz ejerció un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria experimental, que se manifestó en un comportamiento clínico más maligno de los adenocarcinomas (aparición más temprana de los tumores, mayor número de animales afectados y mayores contenido y volumen tumorales).

3.2. La dieta rica en aceite de oliva se asoció a un efecto potencialmente protector de la carcinogénesis mamaria experimental, manifestado a través de un tiempo de latencia y una incidencia de afectación similares a los del grupo control, y un contenido y volumen tumorales menores incluso que los de este grupo.

**4. De la estandarización de un método de aislamiento de dominios de membrana en hígado de rata y su validación en adenocarcinomas mamaros experimentales:**

4.1. A partir de la distribución de proteínas totales y la presencia de Col y proteínas específicas, se consiguió estandarizar un método de aislamiento de DRMs basado en la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y la utilización del detergente no

iónico Tritón X-100 a +4°C en tejido hepático. Posteriormente se comprobó su validez en adenocarcinomas mamarios experimentales.

- 4.2. La cromatografía en capa fina resultó ser un buen mejor método para cuantificar los niveles de Col en tejidos de rata, en contraposición a los kits comerciales. Asimismo, constituyó un buen método para el estudio de la composición lipídica de la membrana y sus dominios.
- 4.3. En tejido hepático, las fracciones 2, 3, 4 y 5 se caracterizaron como LR, por su enriquecimiento en Flot1; la fracción 3 correspondió a caveolas, por su contenido en Cav1; y las fracciones 10, 11 y 12 se establecieron como MS, dada la presencia de rTf. En cambio, en los adenocarcinomas mamarios las fracciones 1, 2, 3 y 4 correspondieron a LR, por su contenido en Col, SM y Flot1; en la mayoría de los casos, la fracción 2 correspondió a caveolas, tanto por su contenido en Col y SM como por su enriquecimiento en Cav1; y el resto de fracciones de membrana se consideraron MS, por su bajo contenido en Col y SM, y la presencia de rTf.

**5. De la caracterización de la composición lipídica de la membrana de los adenocarcinomas mamarios experimentales:**

- 5.1. Las membranas de las células tumorales mamarias mostraron un enriquecimiento en Col y Cer, lo cual podría relacionarse con el balance proliferación/apoptosis propio de las células cancerosas. En cambio, los fosfolípidos se hallaron en cantidades relativamente bajas, siendo PC el mayoritario.
- 5.2. Las membranas de las células tumorales mamarias presentaron elevados niveles de SFA, seguidos de MUFA y, finalmente, PUFA. Este perfil se modificó por efecto de los lípidos de la dieta.
- 5.3. Tanto en membrana total como en los dominios aislados se detectaron altos niveles de TAG. Dado que estos lípidos neutros no son propios de la membrana celular, dichos TAG podrían proceder de LD (o gotitas lipídicas) presentes en las células tumorales. Por tanto, el método de aislamiento de DRMs estandarizado permitió aislar también dichos lípidos.

**6. Del análisis del efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición de la membrana de los adenocarcinomas mamarios experimentales:**

- 6.1. Las dietas ricas en aceite de maíz y aceite de oliva modificaron diferencialmente la composición de proteínas de la membrana de las células tumorales. Mientras los niveles de Flot1 en LR no mostraron cambios por efecto de la dieta, los niveles de Cav1 disminuyeron con la dieta rica en aceite de oliva, promoviendo así una menor

### Conclusiones

formación de caveolas. La disminución de Cav1 estaría de acuerdo con la mayor benignidad de los tumores de este grupo dado el papel promotor de la tumorigénesis mamaria que tiene Cav1 en el tumor ya establecido.

- 6.2. Los lípidos de la dieta no modificaron sustancialmente el contenido de los distintos tipos de lípidos de la membrana a nivel de membrana total, MS y caveolas.
- 6.3. La mayor influencia de los lípidos de la dieta se observó en LR. Así, la dieta rica en aceite de maíz aumentó significativamente el contenido en Col y SM, lo cual se asociaría a una mayor formación de *Chol-Rafts*, relacionados con vías de proliferación y supervivencia celular. Dicha dieta también se asoció a un aumento de PI y PC. En cambio, la dieta de aceite de oliva produjo un aumento de la ratio Cer/SM, sugiriendo una mayor formación de *Cer-Rafts*, implicados en muerte celular por apoptosis. En concordancia con este resultado, los niveles de la proteína pro-apoptótica CD95 tendieron a aumentar por efecto de esta dieta. La dieta de aceite de oliva también se asoció a una disminución de PE.
- 6.4. La dieta rica en aceite de maíz aumentó los niveles de TAG, indicando una mayor presencia de LD en los tumores de este grupo, de acuerdo con el mayor fenotipo secretor que previamente se había identificado en estos tumores. Este aumento de LD podría asociarse con el efecto estimulador de esta dieta dada la relación existente entre estas estructuras lipídicas y el aumento de malignidad y supervivencia en células tumorales frente al estrés.
- 6.5. Los lípidos de la dieta modificaron diferencialmente el contenido en ácidos grasos de la membrana total. Mientras la dieta rica en aceite de maíz enriqueció la membrana en PUFA n-6, fundamentalmente en ácido linoleico (C18:2 n-6), la dieta rica en aceite de oliva aumentó el contenido en MUFA n-9, mayoritariamente en ácido oleico (C18:1 n-9). Ambas dietas disminuyeron los niveles de ácido palmítico (C16:0), especialmente la dieta de aceite de oliva.
- 6.6. Los lípidos de la dieta también modificaron el contenido en ácidos grasos de la MS. Tanto la dieta de aceite de maíz como la de aceite de oliva aumentaron los niveles de PUFA n-6, concretamente de ácido araquidónico (C20:4 n-6).
- 6.7. El enriquecimiento en determinados ácidos grasos por efecto de las dietas hiperlipídicas se ejerció de manera diferencial y selectiva. Así, los PUFA n-6, mayoritarios en el aceite de maíz, se incorporaron principalmente en MS, mientras que los MUFA n-9, mayoritarios en el aceite de oliva, lo hicieron en dominios diferentes de la membrana soluble, como los LR.

### Conclusiones

- 6.8. Los cambios en la composición proteica y lipídica de la membrana promovidos por la dieta de aceite de maíz en los tumores mamarios estuvieron de acuerdo con efectos descritos previamente como la estimulación de la vía de supervivencia Akt. En cambio, los cambios inducidos a nivel de membrana por la dieta rica en aceite de oliva estuvieron en línea con la disminución de la actividad de p21Ras, la *down-regulation* de Akt y la estimulación de la apoptosis.
- 6.9. Los efectos moduladores diferenciales de las dietas ricas en aceite de maíz y en aceite de oliva en la promoción de la carcinogénesis mamaria, estimulador y protector respectivamente, se ejercerían, al menos en parte, mediante cambios en la composición de la membrana de las células tumorales.

---

Introducción

Material y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

**Bibliografía**



## Bibliografía

### NOTA:

El número de las referencias se corresponde con el que posee cada una de ellas en la base de datos donde se encuentran informatizadas.

## Bibliografía

- [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.
- [442] HUGGINS C, BRIZIARELLI G and SUTTON H Jr. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. *J Exp Med.* 1959,109(1):25-42.
- [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.
- [576] WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World health organization histological typing of breast tumors- second edition. *Am. J. Clin. Pathol.* 1982,78:806-816.
- [472] Nagasawa H, Yanai R and Taniguchi H. Importance of mammary gland DNA synthesis on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res.*, 1976, 36, 2223-2226.
- [566] ROWETT HGQ. Guías de Disección. III - La Rata (con notas sobre el ratón), colección Guías Urania, URANIA SA, Barcelona, 1976.
- [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.
- [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.
- [840] BUTCHER RL, COLLINS WE and FUGO NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology.* 1974, 6, 1704-1708.
- [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.
- [922] CARROLL KK. Neutral fats and cancer. *Cancer Res.* 1981, 41:3695-3699.
- [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.

## Bibliografia

- [935] SPRATT JS, GREENBERG RA and HEUSER LS. Geometry, growth rates, and duration of cancer and carcinoma in situ of the breast before detection by screening. *Cancer Res.* 1986,46(2):970-4.
- [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.
- [1023] CAMPBELL CS, SCHWARTS NB and FIRLIT MG. The role of adrenal and ovarian steroids in the control of serum LH and FSH *Endocrinology.* 1977, 101:162-172.
- [1029] NEMOTO N. Marked activation of benzo(a)pyrene to protein-binding forms in the presence of unsaturated fatty acids and heme-compounds. *Carcinogenesis*, 1986, 7:267-71.
- [1030] HOUDEBINE LM. Contrôle hormonal du développement et de l'activité de la glande mammaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1986, 26:523-41.
- [1046] IP C and IP MM. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12- dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 66:291-95.
- [1047] CAVE WT Jr and JURKOWSKI JJ. Dietary lipid effects on the growth membrane composition, and prolactin-binding capacity of rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 73:185-91.
- [1077] COHEN LA. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res.*, 1981, 41:3808-10.
- [1106] 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(1):43-51.
- [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.
- [1232] KRAUS AL. Research methodology. En "The laboratory rat Vol.II, Research applications". HJ BAKER, JR LINDSEY, SH WEISBROTH, Academic Press, New York, 1980,28:28-152s.
- [1295] ESCRICH E, RUIZ DE VILLA MC, MURILLO J, DOMINGUEZ E and SAEZ S. Incidence, mean number and volume of malignant mammary tumors experimentally induced with DMBA, in control conditions and under treatment with an androgenic derivate. *J. Steroid Biochem.*,1987, 28:152s.
- [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.

## Bibliografía

- [1486] IP C, IP M and SYLVESTER PW. Relevance of trans fatty acids and fish oil in animal tumorigenesis studies. En "Dietary Fat and Cancer", ALAN R LISS Inc, New York, 1986, 283-94.
- [1489] AYLSWORTH CF, WELSCH CW, KABARA JJ and TROSKO JE. Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat. *Lipids*, 1987, 22:445-54.
- [1518] SPECTOR AA and BURNS CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.*, 1987, 47:4529-37.
- [1520] RUSSO J and RUSSO IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 1987, 57:112-37.
- [1524] RUSSO J, TAY LK, CIOCCA DR and RUSSO IH. Molecular and cellular basis of the mammary gland susceptibility to carcinogenesis. *Environ Health Perspect.*, 49:185-99.
- [1560] LOMEIO F, KHOKHER MA and DANDONA P. Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog. Lipid Res.*, 1986, 25:511-13.
- [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.
- [1610] BAKER DEJ. Reproduction and breeding. En "The laboratory rat. Vol I. Biology and diseases". HJ BAKER, JR LINDSEY, SH WISBROTH. Academic Press, New York, 1979, 153-168.
- [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.
- [1674] DOMENECH JH. Estrategia para el análisis de relaciones entre más de dos caracteres cualitativos. En "Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores". JM DOMENECH, Herder, Barcelona, 1977, 216-24.
- [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.
- [1942] BIRT DF1, KRIS ES, CHOE M and PELLING JC. Dietary energy and fat effects on tumor promotion. *Cancer Res.* 1992, 52 :2035-2039.
- [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.
- [2054] CHOE M1, KRIS ES, LUTHRA R, COPENHAVER J, PELLING JC, DONNELLY TE and BIRT DF. Protein kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from Sencar mice fed high fat diets. *J Nutr.* 1992, 122: 2322-2329.
- [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.

## Bibliografía

- [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 "Revisión: 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.
- [2390] BARBACID M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987, 56:779-827.
- [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.

## Bibliografía

- [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] E XTON 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 RENSBERG 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- $\alpha$ , neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis*, 1995, 16:3087-92.
- [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.
- [3018] GERBER M. Olive oil, monounsaturated fatty acids and cancer. *Cancer Lett.* 1997, 114(1-2):91-2.
- [3019] MARTIN-MORENO JM, WILLETT WC, GORGOJO L, BANEGAS JR, RODRIGUEZ-ARTALEJO F and FERNANDEZ-RODRIGUEZ. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1994, 58(6):774-80.
- [3060] SUNDRAM K1, KHOR HT, ONG AS and PATHMANATHAN R. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res.* 1989, 49(6):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.

## Bibliografia

- [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.
- [3154] NODING R1, SCHONBERG SA, KROKAN HE and BJERVE KS. Effects of polyunsaturated fatty acids and their n-6 hydroperoxides on growth of five malignant cell lines and the significance of culture media. *Lipids*. 1998, 33(3):285-93.
- [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:S15235-S95.
- [3229] VISIOLI F and GALLI C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agricult. Food Chem.*, 1998, 10:4292-96.
- [3321] WREN BG. Do progestagens reduce the risk of breast cancer? A review of the evidence. *Menopause*, 1996, 3:4-12.
- [3326] IBRAHIM NK and HORTOBAGYI GN. New antiestrogens in breast cancer: a review. *Breast J.*, 1998, 4:213-29.
- [3229] VISIOLI F and GALLI C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev.* 1998, 56:142-7.
- [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.
- [3368] HEGSTED DM1, AUSMAN LM, JOHNSON JA and DALLAL GE. Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. *Am J Clin Nutr.* 1993,57 :875-883.
- [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, AUGÉ N, SUC I, FRISACH MF, SALVAYRE R and NEGRE-SALVAYRE A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ. Res.*, 1999, 85:892-99.
- [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.

## Bibliografia

- [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
- [3570] GALLI C and VISIOLI F. Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids*. 1999;34 Suppl:S23-6.
- [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 receptor signalling pathway by attenuation of receptor dephosphorylation. Differential response in Syrian hamster embryo tumor suppressor phenotypes. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:19269-19276.
- [3840] LEE MM and LIN SS. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:221-48.
- [3844] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.*, 2000, 83:S59-S66.
- [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(4):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(8):647-59.
- [3857] KACHHAP SK, DANGE P and NATH GHOSH S. Effect of  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Let.*, 2000, 154:115-20.
- [3860] ASSMANN G, DE BACKER G, BAGNARA S, BETTERIDGE J, CREPALDI G, FERNANDEZ-CRUZ A, GODTFREDSSEN J, JACOTOT B, PAOLETTI R, RENAUD S, RICCI G, ROCHA E, TRAUTWEIN E, URBINATI GC, VARELA G and WILLIAMS C. Olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. *Br J Nurs*. 1997, 6(12):675-7.
- [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(6):545-50.
- [3920] COLLETT ED, DAVIDSON LA, FAN YY, LUPTON JR and CHAPKIN RS. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 May;280(5):C1066-75.

## Bibliografía

- [3923] WEISS L and GREEP RD. La glándula mamaria. En "Histología". Ed. "El Ateneo", Barcelona, 1982, 4ª ed., 822-45.
- [3924] ROSEN PP and OBERMAN HA. Anatomy. En "Tumors of the mammary gland". ROSAI J and SOBIN LH, AFIP, Washington DC, 1992, 11-13.
- [3929] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 2001, 131:1129-32.
- [3935] PINHEIRO JC and BATES DM. Mixed-effects models in S and S-Plus. En "Statistics and computing series". Editorial Springer-Verlag New York, 2000.
- [3947] ESCRICH E, SOLANAS M, SOLER M, RUIZ DE VILLA MC, SÁNCHEZ JA and SEGURA R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.*, 2001, 12:536-49.
- [3973] HANAHAN D and WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100:57-70.
- [3977] KARMALI RA, DONNER A, GOBEL S and SHIMAMURA T. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on 7,12 dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.* 1989, 9:1161-7
- [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.
- [4003] EL-ELA SH, PRASSE KW, CARROLL R and BUNCE OR. Effects of dietary primrose oil on mammary tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Lipids*. 1987, 22(12):1041-4.
- [4007] GUTHRIE N and CARROLL KK. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog Lipid Res.* 1998, 38(3):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( $\alpha$ )anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 1999, 59:4285-90.
- [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.
- [4088] MALANEY S, DALY RJ. The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001, 6:101-113.
- [4135] HANCOCK JF, PATERSON H, and MARSHALL CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*. 1990, 63: 133-139.
- [4136] HANCOCK JF, MAGEE AI, CHILDS JE, and MARSHALL CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*. 1989, 57:1167-1177.
- [4137] MAGEE T. and MARSHALL C. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell*. 1999, 98: 9-12.
- [4138] CHOY E, CHIU VK, SILLETTI J, FEOKTISTOV M, MORIMOTO T, MICHAELSON D, IVANOV IE and PHILIPS MR. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*. 1999, 98:69-80.
- [4146] Campbell SL1, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 1998, 17: 1395-1413.
- [4155] HWANG D. Fatty acids and immune responses - A new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:431-56.
- [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.

## Bibliografía

- [4198] PRIOR IA and HANCOCK JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J. Cell Sci.*, 2001, 114: 1603-08.
- [4200] Stahlhut M, Sandvig K and van Deurs B. Caveolae: uniform structures with multiple functions in signaling, cell growth, and cancer. *Exp Cell Res.* 2000,261(1):111-8.
- [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.
- [4205] ESCRICH E, SOLANAS M, BAILLY C, RUIZ DE VILLA MC and SAEZ S. Effects of an androgenic derivative on the development of chemically-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Anticancer Res.* 1994 ,14(2A):539-43.
- [4206] COSTA I, ESQUIUS J, SOLANAS M, MORAL and ESCRICH E. Histopathologic characteristics of chemically-induced mammary adenocarcinomas in rats fed diets high in (n-6) polyunsaturated lipids. *Virchows Archiv*, 2001, 439:310-311.
- [4216] SIMONS K and IKONEN E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387:569-72.
- [4264] COSTA I, SOLANAS M and ESCRICH E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2002, 126(8): 915-27.
- [4300] STARK AH and MADAR Z. Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *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, 21:745-53.
- [4304] APOLLONI A, PRIOR IA, LINDSAY M, PARTON RG and HANCOCK JF. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol.* 2000,20:2475-2487.
- [4307] PRIOR IA, HARDING A, YAN J, SLUIMER J, PARTON RG and HANCOCK JF. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol.* 2001, 3(4):368-375.
- [4313] KENWORTHY A. Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem Sci.* 2002, 27(9):435-437.
- [4319] SMART EJ, GRAF GA, MCNIVEN MA, SESSA WC, ENGELMAN JA, SCHERER PE, OKAMOTO T and LISANTI MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1999, 19(11):7289-7304.
- [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.
- [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] BOTHJA 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 $\alpha$  and ER $\beta$  is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003, 81:209-21.
- [4506] MAGEE PJ and ROWLAND IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British J. Nut.*, 2004, 91:513-31.
- [4534] NATHANSON KN, WOOSTER R and WEBER BL. Breast Cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Med.*, 2001, 7(5):552-56.
- [4537] THOMPSON HJ and SINGH M. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000, 5(4):409-20.

## Bibliografía

- [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.
- [4595] KEEN JC and DAVIDSON NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 2003, 97:825-33.
- [4609] WILLIAMS TM and LISANTI MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med.* 2004, 36:584-595.
- [4610] HANCOCK JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003, 4:373-384
- [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.
- [4623] NAROD SA and FOULKES WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews*, 2004, 4:665-76.
- [4631] OCHOA-HERRERA JJ, HUERTAS JR, QUILES JL and MATAIX J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J. Nut. Biochem.*, 2001, 12:357-64.
- [4633] QUILES JL, OCHOA JJ, RAMIREZ-TORTOSA C, BATTINO M, HUERTAS JR and MARTÍN Y, MATAIX J. Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Exp Gerontol.* 2004, 39(8):1189-98.
- [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.
- [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.
- [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.

## *Bibliografia*

- [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[ $\alpha$ ]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.
- [4829] SMITH TJ. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000, 9(8):1841-8.
- [4837] KOSOY 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.
- [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.
- [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, YAQOOB P, THIES F, WALLACE FA and MILES EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.*, 2002, 87:S31-S48.
- [4994] YAQOOB 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.
- [5060] ENGELMAN DM. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 2005, 438:578-80.
- [5149] MENENDEZ JA, VELLON L, COLOMER R and LUPU R. Effect of  $\delta$ -linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, 97:1611-15.
- [5198] WASSALL SR, BRZUSTOWICZ MR, SHAIKH SR, CHEREZOV V, CAFFREY M and STILLWELL W. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids*. 2004, 132(1):79-88.
- [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, YAQOOB P, CAB International, Oxfordshire, UK, 2006, pp. 317-74.
- [5383] LI YC, PARCK MJ, YE SK, KIM CW and KIM YN. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol*. 2006, 168:1107-1118.
- [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.
- [5424] STILLWELL W, SHAIKH SR, ZEROUGA M, SIDDIQUI R and WASSALL SR. Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev*. 2005, 45:559-579.
- [5437] SEO J, BARHOUMI R, JOHNSON AE, LUPTON JR and CHAPKIN RS. Docosahexaenoic acid selectively inhibits plasma membrane targeting of lipidated proteins. *FASEB J*. 2006, 20(6):770-2.
- [5439] HANCOCK JF and PARTON RG. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem. J.*, 2005, 389:1-11.
- [5446] WILLIAMS TM and LISANTI MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005, 288(3):C494-506.

## Bibliografia

- [5447] RAZANI B, WOODMAN SE and LISANTI MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54:431-67.
- [5448] SHAIKH SR and EDIDIN MA. Membranes are not just rafts. *Chem Phys Lipids*. 2006, 144:1-3.
- [5449] RAJENDRAN L and SIMONS K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.*, 2005, 118:1099-102.
- [5450] FÜLLERKRUG J and SIMONS K. Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci*. 2004,1014:164-9.
- [5451] SIMONS K and VAZ WLC. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004, 33:269-95.
- [5452] LI Q, ZHANG Q, WANG M, ZHAO S, MA J, LUO N, LI N, LI Y, XU G and LI J. Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Biochimie*. 2007, 89:169-177.
- [5453] ZHUANG L, KIM J, ADAM RM, SOLOMON KR and FREEMAN MR. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest*. 2005,115:959-68.
- [5456] MCCALLUM DE and HALL PA. Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res*. 1999,252(1):186-98.
- [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.
- [5466] HARDER T and ENGELHARDT KR. Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic*. 2004,5(4):265-75.
- [5473] GRI G, MOLON B, MANES S, POZZAN T and VIOLA A. The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett*. 2004, 94:247-252.
- [5476] SINGER SJ and NICOLSON GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972, 175(4023):720-731.
- [5484] WALKER SA and LOCKYER PJ. Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci.*, 2004, 117:2879-86.
- [5486] Bourne HR1, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990,348(6297):125-132.
- [5488] REUTHER GW and DER CJ. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol*. 2000, 12:157-165.
- [5493] UMANOFF H, EDELMANN W, PELLICER A and KUCHERLAPATI R. The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995,92:1709-13.
- [5494] JOHNSON L, GREENBAUM D, CICHOWSKI K, MERCER K, MURPHY E, SCHMITT E, BRONSON RT, UMANOFF H, EDELMANN W, KUCHERLAPATI R and JACKS T. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev*. 1997,11:2468-81.
- [5496] STILLWELL W and WASSALL SR.. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids*. 2003,126(1):1-27.
- [5498] EDIDIN M. Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr Opin Struct Biol*. 1997, 7(4):528-32.
- [5500] SZACHOWICZ-PETELSKA B, SULKOWSKI S and FIGASZEWSKI ZA. Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. *Mol Cell Biochem*. 2007, 294:237-242.
- [5501] FAN YY, McMURRAY DN, LY LH and CHAPKIN RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr*. 2003 Jun;133:1913-1920.
- [5502] SWITZER KC, McMURRAY DN and CHAPKIN RS. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on T-cell membrane composition and function. *Lipids*. 2004,39:1163-1170.
- [5516] VETTER IR and WITTINGHOFER A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001,294:1299-304.
- [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.
- [5627] MINEO C, GILL GN and ANDERSON RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem*. 1999, 274:30636-43.
- [5628] ROEPSTORR K, THOMSEN P, SANDVIG K and VAN DEURS B. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem*. 2002,277:18954-60.

## *Bibliografia*

- [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.
- [5719] SIMONS K and IKONEN E. How cells handle cholesterol. *Science*. 2000, 290:1721-1726.
- [5734] CASTELLANO E, DE LAS RIVAS J, GUERRERO C and SANTOS E. Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses. *Oncogene*. 2007,26(6):917-33.
- [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.
- [5773] HUNTER DJ, SPIEGELMAN D, ADAMI HO, BEESON L, VAN DEN BRANDT PA, FOLSOM AR, FRASER GE, GOLDBOHM RA, GRAHAM S, HOWE GR, et al. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N Engl J Med*. 1996,334:356-61.
- [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.
- [5947] CHEN W, JUMP DB, ESSELMAN WJ and BUSIK JV. Inhibition of cytokine signaling in human retinal endothelial cells through modification of caveolae/lipid rafts by docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007,48(1):18-26.
- [5963] BINGHAM SA, LUBEN R, WELCH A, WAREHAM N, KHAW KT and DAY N. Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet*. 2003,362:212-4.
- [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.
- [5975] DE WAARD F and THIJSSSEN 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.
- [6016] BIONDO PD, BRINDLEY DN, SAWYER MB and FIELD CJ. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. *J Nutr Biochem*. 2008 Dec;19(12):787-96.
- [6043] CHAPKIN RS, WANG N, FAN YY, LUPTON JR and PRIOR IA. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. *Biochim Biophys Acta*. 2008,1778(2):466-71.
- [6046] CHAPKIN RS, SEO J, McMURRAY DN and LUPTON JR. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem Phys Lipids*. 2008,153(1):14-23.

## *Bibliografia*

- [6050] MOR A and PHILIPS MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:771-800.
- [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.
- [6077] KINNULA VL and CRAPO JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 36:718-44.
- [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.
- [6164] GIL C, SOLER-JOVER A, BLASI J and AGUILERA J. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 329(1):117-24.
- [6165] GIL C, CUBÍ R, BLASI J and AGUILERA J. Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 348(4):1334-42
- [6166] GIL C, CUBÍ R and AGUILERA J. Shedding of the p75NTR neurotrophin receptor is modulated by lipid rafts. *FEBS Lett.* 2007,581(9):1851-8.
- [6196] COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M and LUNEC J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003, 17(10):1195-214.
- [6219] HESSON LB, COOPER WN and LATIF F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers.* 2007,23(1-2):73-87.
- [6280] ORTEGREN U, YIN L, OST A, KARLSSON H, NYSTROM FH and STRÅLFORS P. Separation and characterization of caveolae subclasses in the plasma membrane of primary adipocytes; segregation of specific proteins and functions. *FEBS J.* 2006,273(14):3381-92.
- [6281] WANG L, LIM EJ, TOBOREK M and HENNING B. The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. *Metabolism.* 2008,57(10):1328-39.
- [6286] GARCIA-MARCOS M, POCHET S, MARINO A and DEHAYE JP. P2X7 and phospholipid signalling: the search of the "missing link" in epithelial cells. *Cell Signal.* 2006,18(12):2098-104.
- [6288] CHEN X, JEN A, WARLEY A, LAWRENCE MJ, QUINN PJ and MORRIS RJ. Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. *Biochem J.* 2009,417(2):525-33.
- [6289] PATRA SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008,1785(2):182-206.
- [6290] MICHEL V and BAKOVIC M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell,* 2007, 99:129-40.
- [6291] BLONDER J, HALE ML, LUCAS DA, SCHAEFER CF, YU LR, CONRADS TP, ISSAQ HJ, STILES BG and VEENSTRA TD. Proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts. *Electrophoresis.* 2004, 25(9):1307-18.
- [6296] SIMONS K and EHEHALT R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 2002, 110(5):597-603.
- [6297] WASSALL SR and STILLWELL W. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. *Chem Phys Lipids.* 2008,153(1):57-63.

## Bibliografia

- [6298] WASSALL SR and STILLWELL W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009,1788(1):24-32.
- [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.
- [6342] YAO Y, HONG S, ZHOU H, YUAN T, ZENG R and LIAO K. The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. *Cell Res*. 2009, 19(4):497-506.
- [6352] LAJOIE P, PARTRIDGE EA, GUAY G, GOETZ JG, PAWLING J, LAGANA A, JOSHI B, DENNIS JW and NABI IR. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J Cell Biol*. 2007:341-56.
- [6355] STAN RV. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta*. 2005,1746:334-48.
- [6357] SHATZ M and LISCOVITCH M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int J Radiat Biol*. 2008 Mar;84(3):177-89.
- [6358] QUEST AF, GUTIERREZ-PAJARES JL and TORRES VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med*. 2008,12(4):1130-50.
- [6359] MISHRA S and JOSHI PG. Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem*. 2007,103 Suppl 1:135-42.
- [6383] SIBYLLE W and LARS-GUNNAR K. A rapid and simple method for electron microscopy of paraffin-embedded tissue. *Ultrastructural Pathology*. 1988, 12:131-136.
- [6407] ORTEGREN U, ABOULAICH N, OST A and STRALFORS P. A new role for caveolae as metabolic platforms. *Trends Endocrinol Metab*. 2007,18(9):344-9.
- [6408] PARTON RG and SIMONS K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):185-94.
- [6410] RODRÍGUEZ-PINILLA SM, SARRIÓ D, HONRADO E, HARDISSON D, CALERO F, BENITEZ J AND PALACIOS J. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1533-9.
- [6413] SLOAN EK, CIOCCA DR, POULIOT N, NATOLI A, RESTALL C, HENDERSON MA, FANELLI MA, CUELLO-CARRIÓN FD, GAGO FE and ANDERSON RL. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol*. 2009,174(6):2035-43
- [6428] SONNINO S and PRINETTI A. Sphingolipids and membrane environments for caveolin. *FEBS Lett*. 2009 Feb 18;583(4):597-606.
- [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.
- [6439] MUKHERJEE A, ARNAUD L and COOPER JA. Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem*. 2003,278(42):40806-14.
- [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.
- [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.

## Bibliografia

- [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.
- [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.
- [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] VINOETHINI G, MANIKANDAN P, ANANDAN R and NAGINI S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Azadirachta indica* leaf fractions: modulation of hormone status, xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(8):1852-63.
- [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.
- [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):23-6.
- [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] YE H CC, HOU MF, WU SH, TSAI SM, LIN SK, HOU LA, MA H and TSAI LY. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 2006, 24(6):555-59.
- [6769] XUE W 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.
- [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.

## Bibliografia

- [6850] FERGUS LR and PHILPOTT M. Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2008, 28:313-329.
- [6856] YAO Y, HONG S, ZHOU H, YUAN T, ZENG R, LIAO K. The differential protein and lipid composition of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. *Cell Research*. 2009, 19:497-506.
- [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.
- [6882] FUJIMOTO T, KOGO H, NOMURA R and UNE T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci*. 2000,113:19:3509-17.
- [6886] LISANTI MP, SCHERER PE, TANG Z and SARGIACOMO M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol*. 1994,4(7):231-5.
- [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.
- [6966] SKIN JH, HUR JY, SEO HS, JEONG YA, LEE JK, OH MJ, KIM T, SAW HS and KIMS H. The ratio of ER $\alpha$  to ER $\beta$  in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 2007, 72:592-99.
- [6991] ISMAIR MG, HÄUSLER S, STUERMER CA, GUYOT C, MEIER PJ, ROTH J and STIEGER B. ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2009,49(5):1673-82.
- [7012] BROWN DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. 2006,21:430-9.
- [7022] ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358:1148-59.
- [7057] RUIZ JI and OCHOA B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J Lipid Res*. 1997,38(7):1482-9.
- [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.
- [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.

## *Bibliografia*

- [7155] LI Q, ZHANG Q, WANG M, ZHAO S, MA J, LUO N, LI N, LI Y, XU G and LIJ. Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Biochimie*. 2007,89(1):169-77.
- [7156] LI Q, ZHANG Q, WANG M, LIU F, ZHAO S, MA J, LUO N, LI N, LI Y, XU G, LI J. Docosahexaenoic acid affects endothelial nitric oxide synthase in caveolae. *Arch Biochem Biophys*. 2007,466(2):250-9.
- [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.
- [7190] IRIGARAY P and BÉLPOUME D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 2010, 31(2):135-48.
- [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.
- [7270] SOTIRIOU C and PUSZTAI L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009,360(8):790-800.
- [7271] WEIGELT B, HORLINGS HM, KREIKE B, HAYES MM, HAUPTMANN M, WESSELS LF, DE JONG D, VAN DE VIJVER MJ, VAN'T VEER LJ and PETERSE JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008,216(2):141-50.
- [7275] PRAT A and PÉROU CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011,5(1):5-23.
- [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.
- [7329] FACKLER MJ, MALONE K, ZHANG Z, SCHILLING E, GARRETT-MAYER E, SWIFT-SCANLAN T, LANGE J, NAYAR R, DAVIDSON NE, KHAN SA and SUKUMAR S. Quantitative multiplex methylation-specific PCR analysis doubles detection of tumor cells in breast ductal fluid. *Clin Cancer Res*. 2006,12:3306-10.
- [7339] MORGADO N, RIGOTTI A and VALENZUELA A. Comparative effect of fish oil feeding and other dietary fatty acids on plasma lipoproteins, biliary lipids, and hepatic expression of proteins involved in reverse cholesterol transport in the rat. *Ann Nutr Metab*. 2005,49(6):397-406.
- [7346] HUOT PS, SARKAR B and Ma DW. Conjugated linoleic acid alters caveolae phospholipid fatty acid composition and decreases caveolin-1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nutr Res*. 2010,30(3):179-85.
- [7347] ROGERS KR, KIKAWA KD, MOURADIAN M, HERNANDEZ K, MCKINNON KM, AHWAH SM and PARDINI RS. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis*. 2010,31(9):1523-30.
- [7349] HANAHAHAN 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.
- [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.
- [7424] VAN MEER G, VOELKER DR and FEIGENSON GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 ,9(2):112-24.
- [7425] YU C, ALTERMAN M, DOBROWSKY RT. Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J Lipid Res*. 2005,46(8):1678-91.
- [7430] MIYAJI M, JIN ZX, YAMAOKA S, AMAKAWA R, FUKUHARA S, SATO SB, KOBAYASHI T, DOMAE N, MIMORI T, BLOOM ET, OKAZAKI T and UMEHARA H. Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*. 2005,202(2):249-59.

## *Bibliografia*

- [7431] BÉNÉTEAU M, PIZON M, CHAIGNE-DELALANDE B, DABURON S, MOREAU P, DE GIORGI F, ICHAS F, REBILLARD A, DIMANCHE-BOITREL MT, TAUPIN JL, MOREAU JF and LEGEMBRE P. Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res.* 2008,6(4):604-13.
- [7433] BOLLINGER CR, TEICHGRÄBER V and GULBINS E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta.* 2005,1746:284-94
- [7434] MEGHA and LONDON E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem.* 2004,279(11):9997-10004.
- [7435] SILVA LC, DE ALMEIDA RF, CASTRO B, FEDOROV A and PRIETO M. Ceramide-domain formation and collapse in lipid rafts: membrane reorganization by an apoptotic lipid. *Biophys J.* 2007,92(2):502-16.
- [7439] CARPINTEIRO A, DUMITRU C, SCHENCK M and GULBINS E. Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer Lett.* 2008,264(1):1-10
- [7442] KOLESNICK RN, GOÑI FM and ALONSO A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol.* 2000,184(3):285-300.
- [7443] GULBINS E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol Res.* 2003,47(5):393-9.
- [7502] KHAN N, ADHAMI VM and MUKHTAR H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010,17(1):R39-52.
- [7503] PETER ME and KRAMMER PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):26-35.
- [7504] PETER ME, BUDD RC, DESBARATS J, HEDRICK SM, HUEBER AO, NEWELL MK, OWEN LB, POPE RM, TSCHOPP J, WAJANT H, WALLACH D, WILTROUT RH, ZÖRNIG M and LYNCH DH. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell.* 2007,129(3):447-50.
- [7505] ZUNDEL W and GIACCIA A. Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* 1998,12(13):1941-6.
- [7506] ZUNDEL W, SWIERSZ LM and GIACCIA A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol.* 2000,20(5):1507-14.
- [7514] CALDER PC and YAQOOB P. Lipid rafts--composition, characterization, and controversies. *J Nutr.* 2007,137(3):545-7.
- [7509] CREMESTI AE1, GONI FM and KOLESNICK R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* 2002,531(1):47-53.
- [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.
- [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.
- [7572] TURK HF and CHAPKIN RS. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013,88(1):43-7
- [7593] VIGH L, ESCRIBÁ PV, SONNLEITNER A, SONNLEITNER M, PIOTTO S, MARESCA B, HORVÁTH I and HARWOOD JL. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. *Prog Lipid Res.* 2005,44(5):303-44.
- [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, MISHPELLANY 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.

## Bibliografia

- [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, KAPRARA A, TARLATZIS BC and GOULIS DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 2012, 62:457-78.
- [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.
- [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.
- [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.

## Bibliografia

- [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.
- [7692] WILLET WC. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol. Sci.*, 1999, 52:S127-S46.
- [7693] YANG L, PANG Y and MOSES HL. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 2010, 31:220-27.
- [7694] SHIELDS JD, KOURTIS IC, TOMEI AA, ROBERTS JM and SWARTZ MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 2010, 328:749-52.
- [7695] DE NARDO DG, ANDREU P and COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29:309-16.
- [7696] QIAN BZ and POLLARD JW. 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.
- [7797] PARTON RG and DEL POZO MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013,14(2):98-112.
- [7799] CORSETTO PA, CREMONA A, MONTORFANO G, JOVENITTI IE, ORSINI F, AROSIO P and RIZZO AM. Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after omega-3 PUFA incorporation. *Cell Biochem Biophys.* 2012,64(1):45-59.
- [7806] GIROS A, GRZYBOWSKI M, SOHN VR, PONS E, FERNANDEZ-MORALES J, XICOLA RM, SETHI P, GRZYBOWSKI J, GOEL A, BOLAND CR, GASSULL MA and LLOR X. Regulation of colorectal cancer cell apoptosis by the n-3 polyunsaturated fatty acids Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009,2(8):732-42.
- [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.

## *Bibliografía*

- [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.
- [8018] VISIOLI F and GALLI C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2002, 42(3):209-21.
- [8069] DONATO MT. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Citocromo P450. ¿Qué es el Citocromo P450 y cómo funciona?, 2003, pag.:29-62.
- [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.
- [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] BELPOMME 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.
- [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.
- [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.
- [8208] EISENBERG S, LAUDE AJ, BECKETT AJ, MAGEEAN CJ, ARAN V, HERNANDEZ-VALLADARES M, HENIS YI and PRIOR IA. The role of palmitoylation in regulating Ras localization and function. *Biochem Soc Trans.* 2013,41(1):79-83.
- [8211] OMEROVIC J, LAUDE AJ and PRIOR IA. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci.* 2007,64(19-20):2575-89.
- [8212] UYY E, IVAN L, BOTEANU RM, SUICA VI and ANTOHE F. High-fat diet alters protein composition of detergent-resistant membrane microdomains. *Cell Tissue Res.* 2013,354(3):771-81.
- [8217] ROCKETT BD, FRANKLIN A, HARRIS M, TEAGUE H, ROCKETT A and SHAIKH SR. Membrane raft organization is more sensitive to disruption by (n-3) PUFA than nonraft organization in EL4 and B cells. *J Nutr.* 2011,(6):1041-8.
- [8218] RAZA SHAIKH S. Diet-induced docosahexaenoic acid non-raft domains and lymphocyte function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010,82:159-64.
- [8223] MacLENNAN MB, CLARKE SE, PEREZ K, WOOD GA, MULLER WJ, KANG JX and MA DW. Mammary tumor development is directly inhibited by lifelong n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2013,24(1):388-95.
- [8227] MCMAHON KA, ZAJICEK H, LI WP, PEYTON MJ, MINNA JD, HERNANDEZ VJ, LUBY-PHELPS K and Anderson RG. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J.* 2009,28(8):1001-15.
- [8229] HANSEN CG, HOWARD G and NICHOLS BJ. Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J Cell Sci.* 2011 Aug 15;124(Pt 16):2777-85.
- [8230] SENJU Y, ITOH Y, TAKANO K, HAMADA S and SUETSUGU S. Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J Cell Sci.* 2011,124:2032-40.
- [8231] STOEBER M, STOECK IK, HÄNNI C, BLECK CK, BALISTRERI G and HELENIUS A. Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *EMBO J.* 2012,31(10):2350-64.
- [8232] LIU L, BROWN D, MCKEE M, LEBRASSEUR NK, YANG D, ALBRECHT KH, RAVID K and PILCH PF. Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab.* 2008,8(4):310-7
- [8234] MORÉN B, SHAH C, HOWES MT, SCHIEBER NL, MCMAHON HT, PARTON RG, DAUMKE O and LUNDMARK R. EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Mol Biol Cell.* 2012,23(7):1316-29.
- [8235] DONATELLO S, BABINA IS, HAZELWOOD LD, HILL AD, NABI IR, HOPKINS M. Lipid raft association restricts CD44-ezrin interaction and promotion of breast cancer cell migration. *Am J Pathol.* 2012,181(6):2172-87.
- [8237] ORSINI F, CREMONA A, AROSIO P, CORSETTO PA, MONTORFANO G, LASCIALFARI A and RIZZO AM. Atomic force microscopy imaging of lipid rafts of human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012,1818(12):2943-9.

## Bibliografia

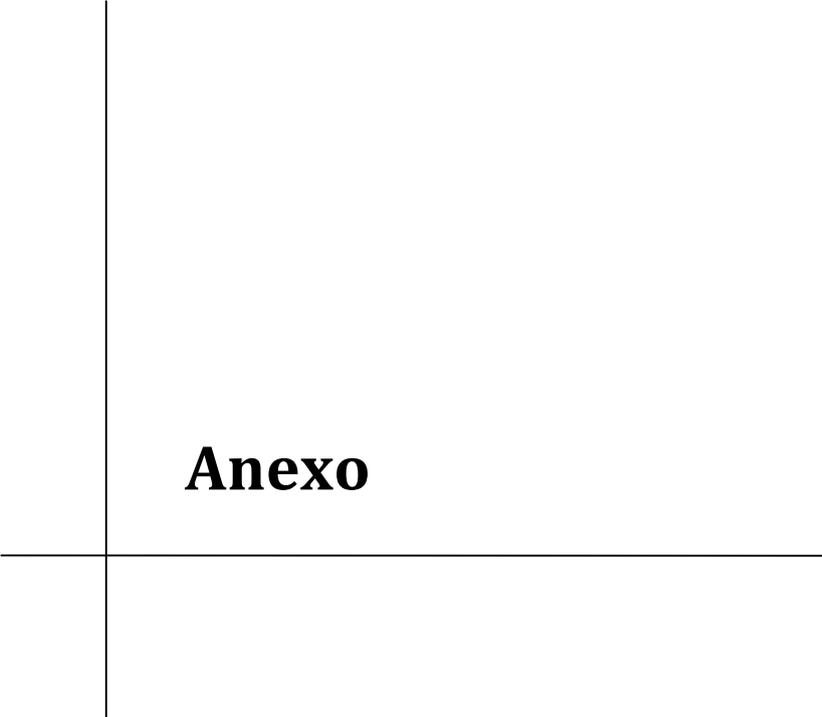
- [8238] GELSOMINO G, CORSETTO PA, CAMPIA I, MONTORFANO G, KOPECKA J, CASTELLA B, GAZZANO E, GHIGO D, RIZZO AM and RIGANTI C. Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. *Mol Cancer*. 2013,13;12:137.
- [8239] LIU J and MA DW. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*. 2014,6(11):5184-223.
- [8246] TAVERNARAKIS N, DRISCOLL M and KYRPIDES NC. The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci*. 1999,24(11):425-7.
- [8248] LANG DM, LOMMEL S, JUNG M, ANKERHOLD R, PETRAUSCH B, LAESSING U, WIECHERS MF, PLATTNER H and STUERMER CA. Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol*. 1998,37(4):502-23.
- [8250] BAUMANN CA, RIBON V, KANZAKI M, THURMOND DC, MORA S, SHIGEMATSU S, BICKEL PE, PESSIN JE and SALTIEL AR. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*. 2000,407(6801):202-7.
- [8251] NEUMANN-GIESEN C, FERNOW I, AMADDII M and TIKKANEN R. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2007,120:395-406.
- [8253] BICKEL PE, SCHERER PE, SCHNITZER JE, OH P, LISANTI MP and LODISH HF. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*. 1997,272(21):13793-802.
- [8255] ORLINICK JR, VAISHNAW AK and ELKON KB. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol*. 1999;18(4):293-308.
- [8256] GREEN DR and FERGUSON TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001,2(12):917-24.
- [8257] HOLLER N, ZARU R, MICHEAU O, THOME M, ATTINGER A, VALITUTTI S, BODMER JL, SCHNEIDER P, SEED B and TSCHOPP J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000,1(6):489-95.
- [8258] ROBENEK H, WEISSEN-PLENZ G and SEVERS NJ. Freeze-fracture replica immunolabelling reveals caveolin-1 in the human cardiomyocyte plasma membrane. *J Cell Mol Med*. 2008 Dec;12(6A):2519-21.
- [8259] PATEL HH, TSUTSUMI YM, HEAD BP, NIESMAN IR, JENNINGS M, HORIKAWA Y, HUANG D, MORENO AL, PATEL PM, INSEL PA and ROTH DM. Mechanisms of cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for caveolae and caveolin-1. *FASEB J*. 2007,21(7):1565-74.
- [8260] SCHLEGEL A, ARVAN P and LISANTI MP. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2001,276(6):4398-408.
- [8261] SARGIACOMO M, SCHERER PE, TANG Z, KÜBLER E, SONG KS, SANDERS MC and LISANTI MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995,92(20):9407-11.
- [8262] ASP N, PUST S and SANDVIG K. Flotillin depletion affects ErbB protein levels in different human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014,1843(9):1987-96.
- [8267] MOLLINEDO F, DE LA IGLESIA-VICENTE J, GAJATE C, ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA A, VILLAPULGARIN JA, CAMPANERO MA and BLANCO-PRIETO MJ. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 2010,29(26):3748-57.
- [8268] SISKIND LJ and COLOMBINI M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem*. 2000,275(49):38640-4.
- [8269] RUIZ-ARGÜELLO MB, BASÁÑEZ G, GOÑI FM and ALONSO A. Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem*. 1996,271(43):26616-21.
- [8270] RUIZ-ARGÜELLO MB, GOÑI FM and ALONSO A. Vesicle membrane fusion induced by the concerted activities of sphingomyelinase and phospholipase C. *J Biol Chem*. 1998,273(36):22977-82.
- [8272] SIEGEL RM, FREDERIKSEN JK, ZACHARIAS DA, CHAN FK, JOHNSON M, LYNCH D, TSIEN RY and LENARDO MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000,288(5475):2354-7.
- [8273] NAGATA S and GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science*. 1995,267(5203):1449-56

## Bibliografía

- [8274] GRASSMÉ H, JENDROSSEK V, RIEHLE A, VON KÜRTHY G, BERGER J, SCHWARZ H, WELLER M, KOLESNICK and GULBINS E. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med.* 2003,9(3):322-30.
- [8276] TEN GROTENHUIS E, DEMEL RA, PONEC M, BOER DR, VAN MILTENBURG JC and BOUWSTRA JA. Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophys J.* 1996,71(3):1389-99.
- [8280] SIMIONESCU N, SIMINOESCU M and PALADE GE. Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol.* 1975,64(3):586-607.
- [8341] MANZANARES MÁ, SOLANAS M, MORAL R, ESCRICH R, VELA E and ESCRICH E. Ontogeny of the major xenobiotic-metabolizing enzymes expression and the dietary lipids modulatory effect in the rat dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer model. *J Biochem Mol Toxicol.* 2014,28(12):539-48.
- [8379] MURAI T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol Chem.* 2015,396(1):1-11.
- [8382] MOLLINEDO F and GAJATE C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul.* 2015,57:130-46.
- [8383] TOPPOZINI L, MEINHARDT S, ARMSTRONG CL, YAMANI Z, KUČERKA N, SCHMID F and RHEINSTÄDTER MC. Structure of Cholesterol in Lipid Rafts. *Phys Rev Lett.* 2014,113(22):228101.
- [8384] GAJATE C and MOLLINEDO F. Lipid rafts and raft-mediated supramolecular entities in the regulation of CD95 death receptor apoptotic signaling. *Apoptosis.* 2015,20(5):584-606.
- [8385] AGUDO-IBAÑEZ L, HERRERO A, BARBACID M and CRESPO P. H-ras distribution and signaling in plasma membrane microdomains are regulated by acylation and deacylation events. *Mol Cell Biol.* 2015,35(11):1898-914.
- [8387] QUINN PJ. Sphingolipid symmetry governs membrane lipid raft structure. *Biochim Biophys Acta.* 2014,1838(7):1922-30.
- [8389] STANCEVIC B and KOLESNICK R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Lett.* 2010,584(9):1728-40.
- [8390] GOÑI FM and ALONSO A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta.* 2009,1788(1):169-77.
- [8391] SHAIKH SR. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *J Nutr Biochem.* 2012,23(2):101-5.
- [8392] PEETLA C, BHAVE R, VIJAYARAGHAVALU S, STINE A, KOOIJMAN E and LABHASETWAR V. Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of and doxorubicin interactions with membrane lipids. *Mol Pharm.* 2010,7(6):2334-48.
- [8393] CABODEVILLA AG, SÁNCHEZ-CABALLERO L, NINTOU E, BOIADJIEVA VG, PICATOSTE F, GUBERN A and CLARO E. Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled  $\beta$ -oxidation of fatty acids. *J Biol Chem.* 2013,288(39):27777-88.
- [8394] HERNÁNDEZ-ALBALADEJO I, RUÍZ-PALACIOS M, GÁZQUEZ A, BLANCO JE, PARRILLA JJ and LARQUÉ E. A method for lipid droplet isolation from human placenta for further analyses in clinical trials. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014,93(11):1198-202.
- [8397] COHEN BC, SHAMAY A and ARGOV-ARGAMAN N. Regulation of lipid droplet size in mammary epithelial cells by remodeling of membrane lipid composition-a potential mechanism. *PLoS One.* 2015,10..
- [8399] DOBRZYŃSKA I, SZACHOWICZ-PETELSKA B, DAREWICZ B and FIGASZEWSKI ZA. Characterization of human bladder cell membrane during cancer transformation. *J Membr Biol.* 2015,248(2):301-7.
- [8401] SPECTOR AA and YOREK MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 1985,26(9):1015-35.
- [8402] SIMONS K and VAN MEER G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* 1988,27(17):6197-202.
- [8403] BLIGH EG and DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959,37:911-7.
- [8404] KARP G. La estructura y función de la membrana plasmática. En "Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos". 7a edición. Editorial Mc.Graw-Hill Educations, México. 2014.
- [8405] NELSON DL and COX MM. Lípidos. En "Lenhinger, principios de bioquímica". 3a edición. Ediciones Omega SA. Barcelona. 2000.
- [8406] NELSON DL and COX MM. Membranas biológicas y transporte. En "Lenhinger, principios de bioquímica". 3a edición. Ediciones Omega SA. Barcelona. 2000.
- [8407] AZORDEGAN N, FRASER V, LE K, HILLYER LM, MA DW, FISCHER G and MOGHADASIAN MH. Carcinogenesis alters fatty acid profile in breast tissue. *Mol Cell Biochem.* 2013,374(1-2):223-32

## *Bibliografía*

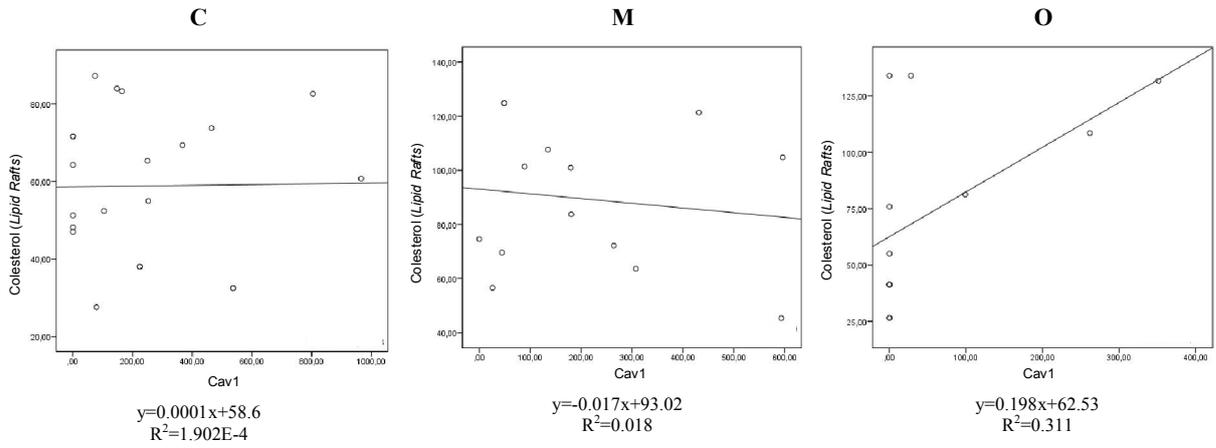
- [8412] HE M, GUO S and LI Z. In situ characterizing membrane lipid phenotype of breast cancer cells using mass spectrometry profiling. *Sci Rep.* 2015,10;5:11298
- [8434] WELTE MA. Expanding Roles for Lipid Droplets. *Curr Biol.* 2015,25(11):470-481.
- [8443] GUBERN A, BARCELÓ-TORNS M, CASAS J, BARNEDA D, MASGRAU R, PICATOSTE F, BALSINDE J, BALBOA MA and CLARO E. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem.* 2009,284(9):5697-708.
- [8447] TARAHOVSKY YS, KIM YA, YAGOLNIK EA and MUZAFAROV EN. Flavonoid-membrane interactions: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014,1838:1235-46.
- [8448] SOSPEDRA I, MORAL R, ESCRICH R, SOLANA M, VELA E and ESCRICH E. Effect of High Fat Diets on Body Mass, Oleylethanolamide Plasma Levels and Oxytocin Expression in Growing Rats. *J Food Sci.* 2015,80(6):H1425-31.
- [8449] MANZANARES MÁ, SOLANAS M, MORAL R, ESCRICH R, VELA E, COSTA I, ESCRICH E. 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. *Eur J Cancer Prev.* 2015,24(3):215-22.
- [8450] YANG G, TRUONG LD, TIMME TL, REN C, WHEELER TM, PARK SH, NASU Y, BANGMA CH, KATTAN MW, SCARDINO PT and THOMPSON TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998,4(8):1873-80.
- [8451] YANG G, TRUONG LD, WHEELER TM and THOMPSON TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker.
- [8452] NIEVA C, MARRO M, SANTANA-CODINA N, RAO S, PETROV D and SIERRA A. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One.* 2012;7(10):46456.
- [8453] GAJATE C, GONZALEZ-CAMACHO F and MOLLINEDO F. Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009,380(4):780-4.



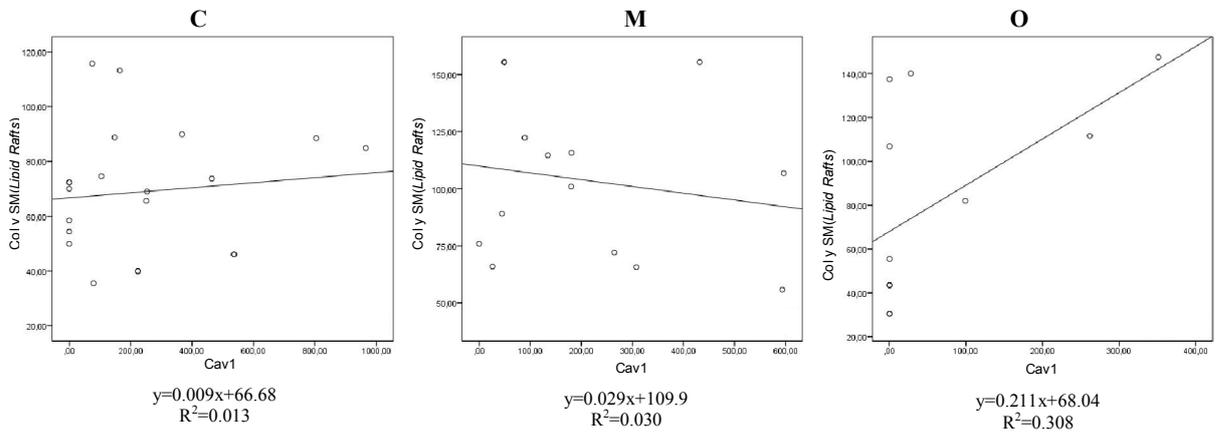
**Anexo**



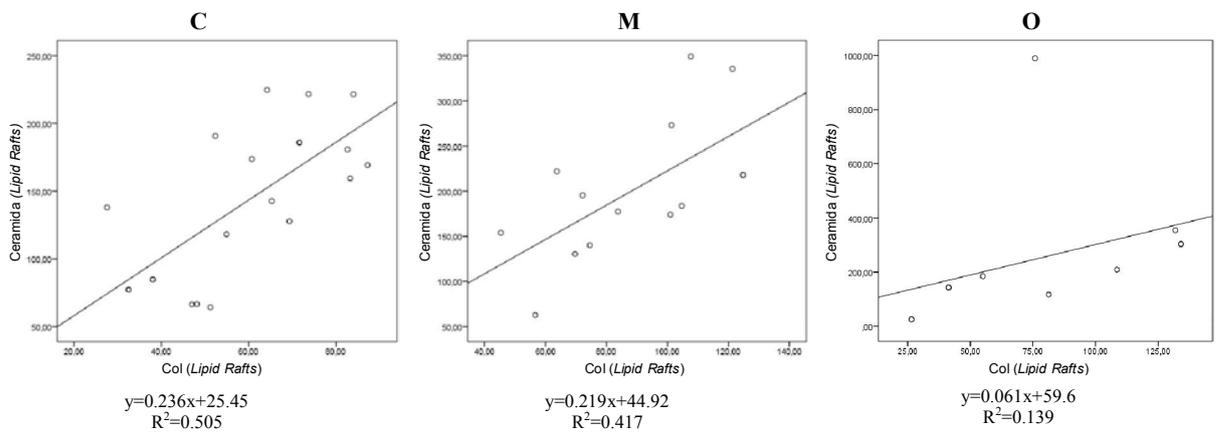
I: Correlación entre los niveles de colesterol y los niveles de Cav1.



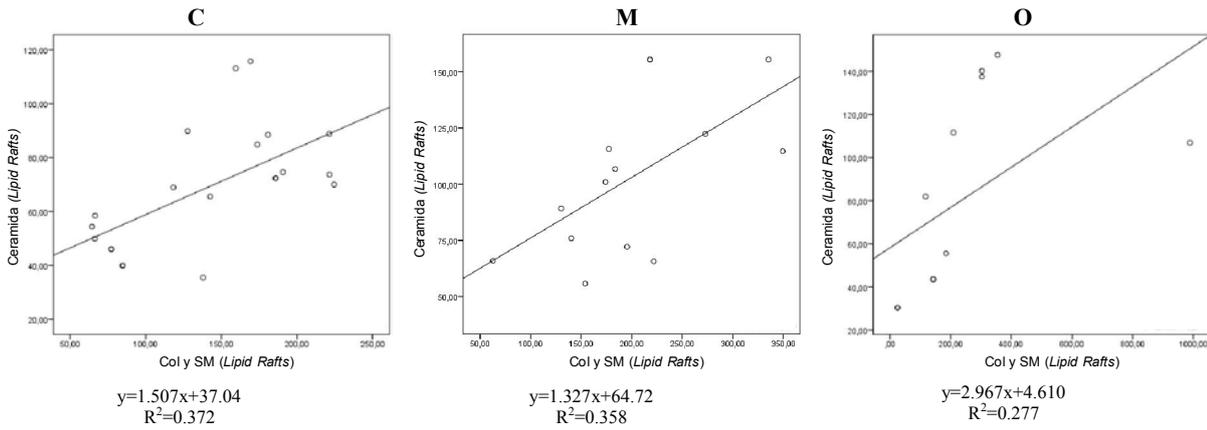
II: Correlación entre los niveles de colesterol y esfingomielina y los niveles de Cav1.



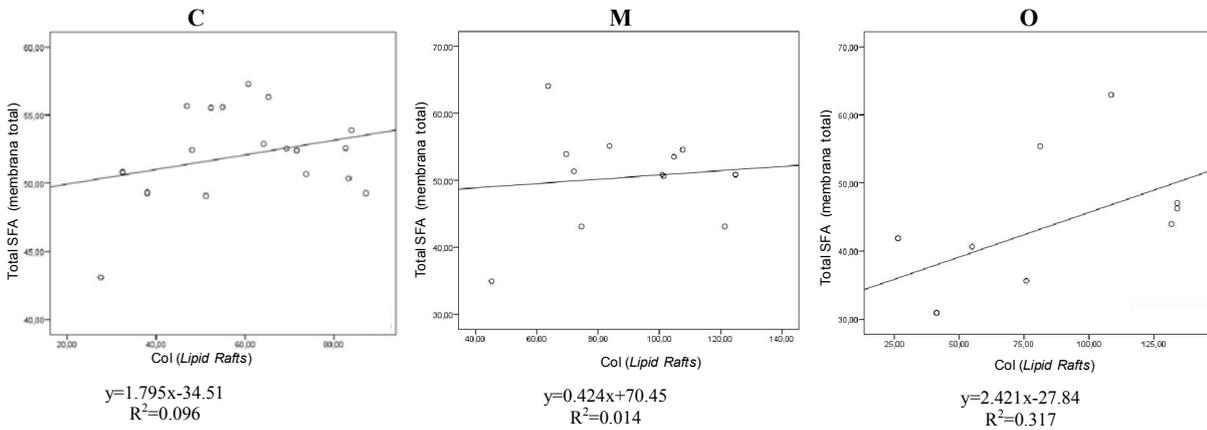
III: Correlación entre los niveles colesterol y los niveles de ceramida.



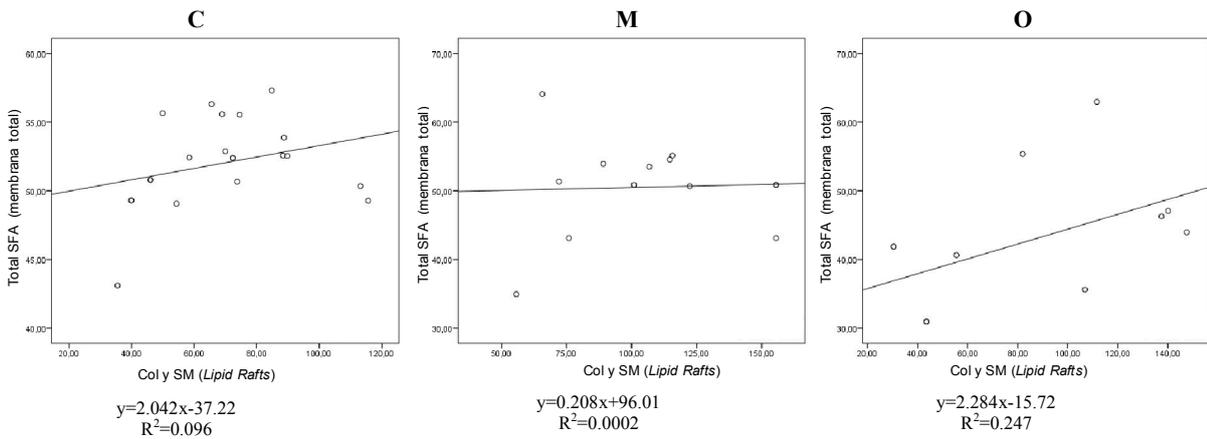
IV: Correlación entre los niveles de colesterol y esfingomiéline y los niveles de ceramida.



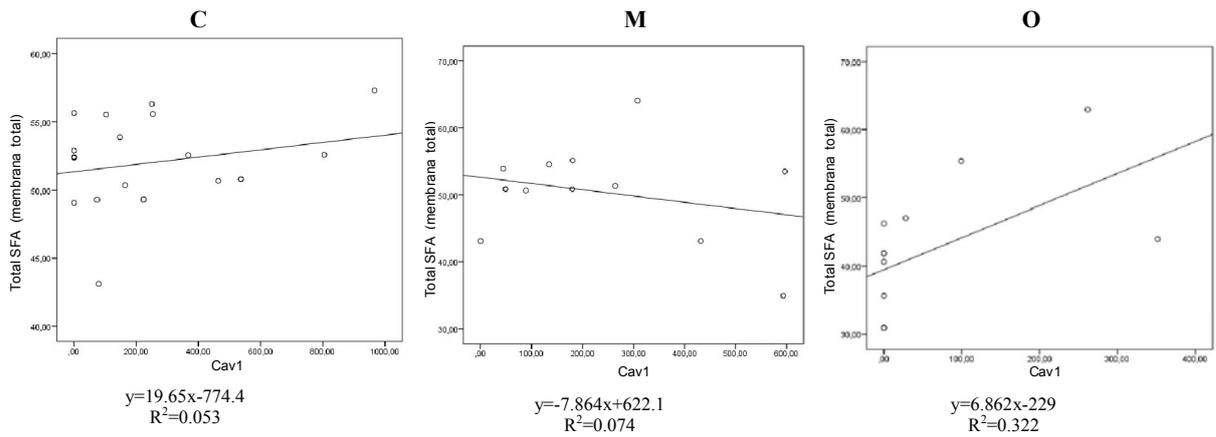
V: Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y colesterol.



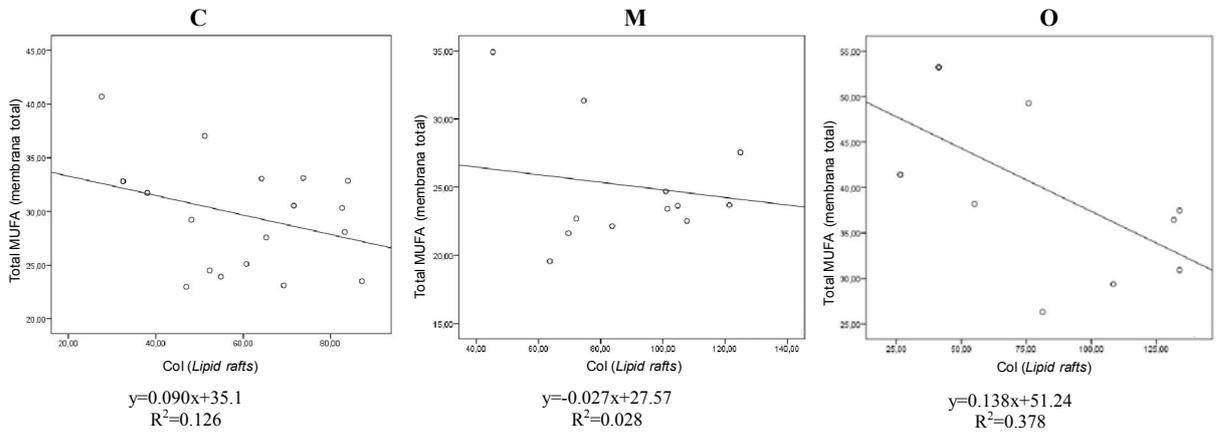
VI: Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y colesterol y esfingomiéline.



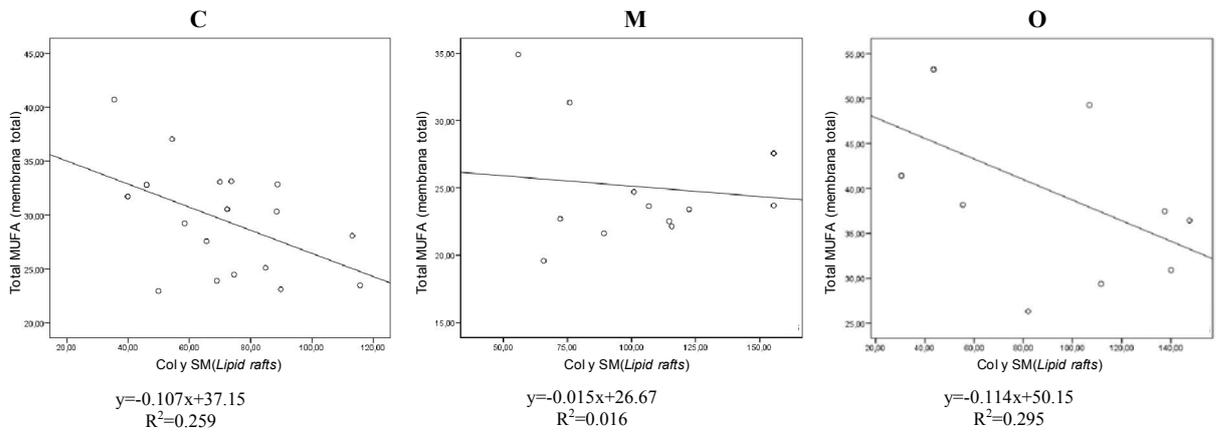
VII: Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y Caveolina1.



VIII: Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y colesterol.

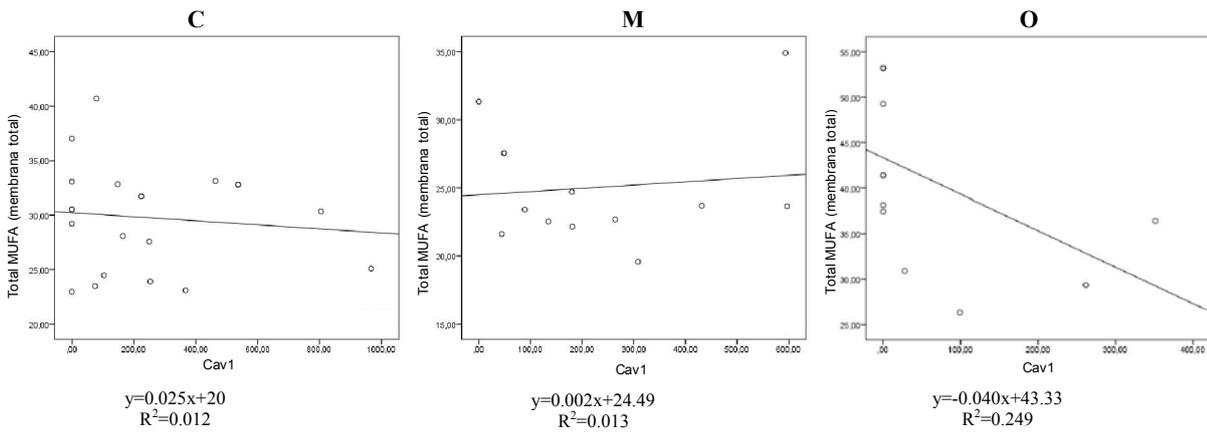


IX: Correlación entre los niveles de SFA de membrana total y colesterol y esfingomielinina.

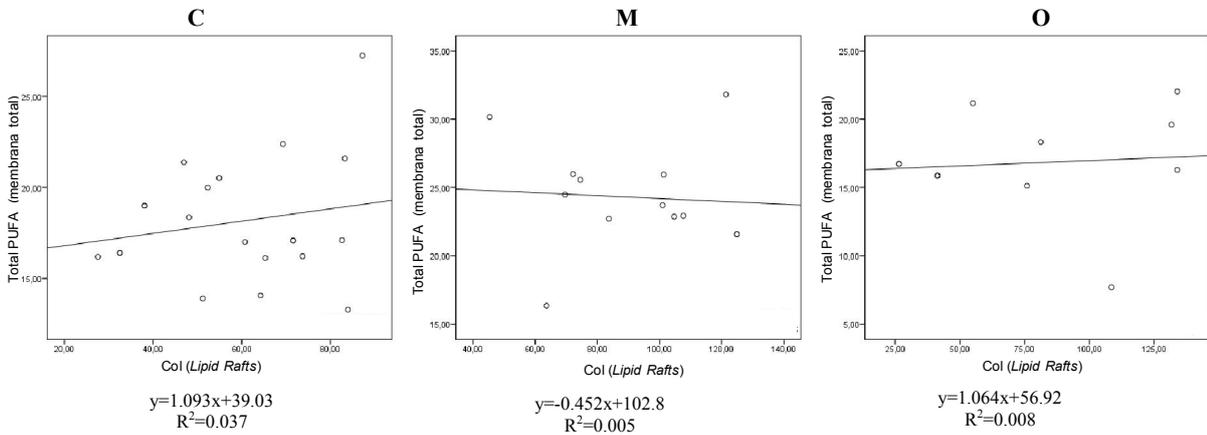


Anexo

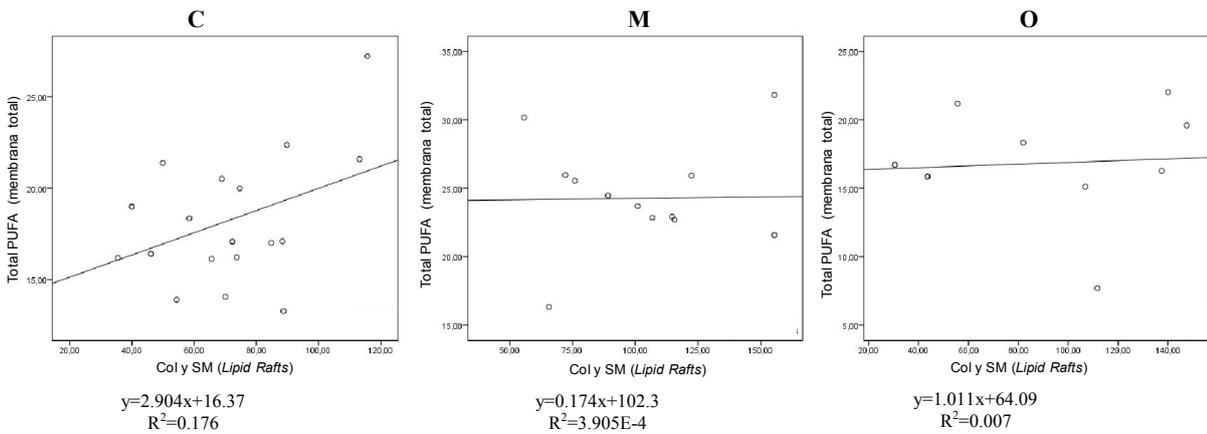
**X: Correlación entre los niveles de MUFA de membrana total y Cav1.**



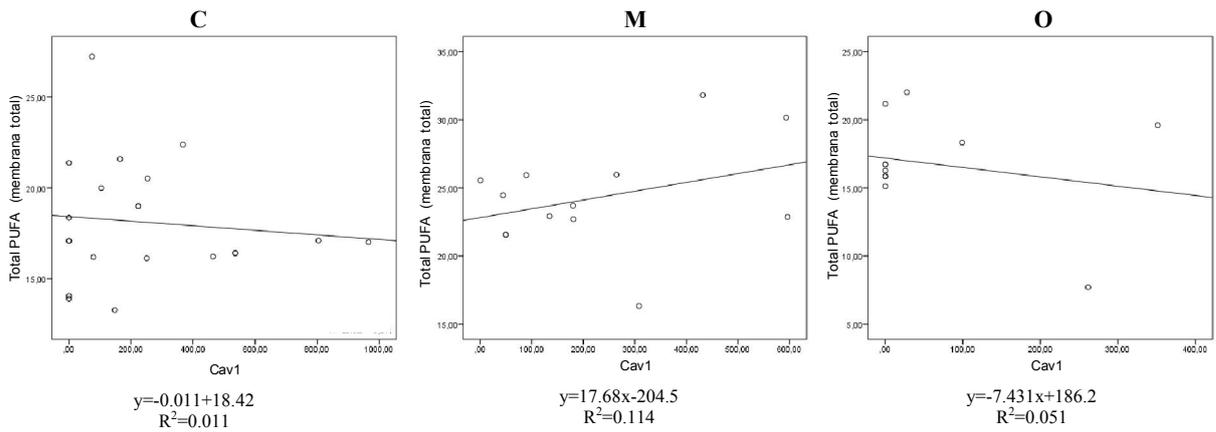
**XI: Correlación entre los niveles de PUFA de membrana total y colesterol.**



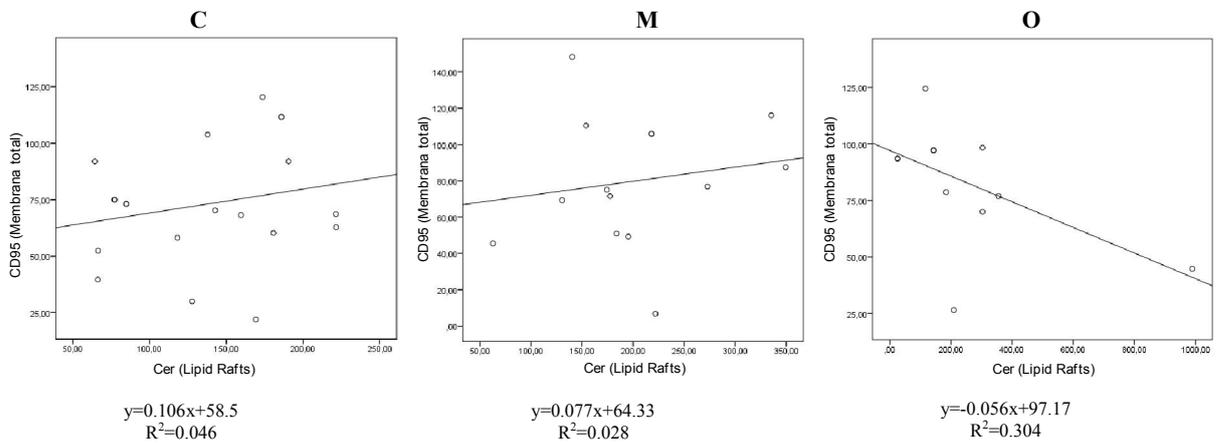
**XII: Correlación entre los niveles de PUFA de membrana total y colesterol y esfingomiélna.**



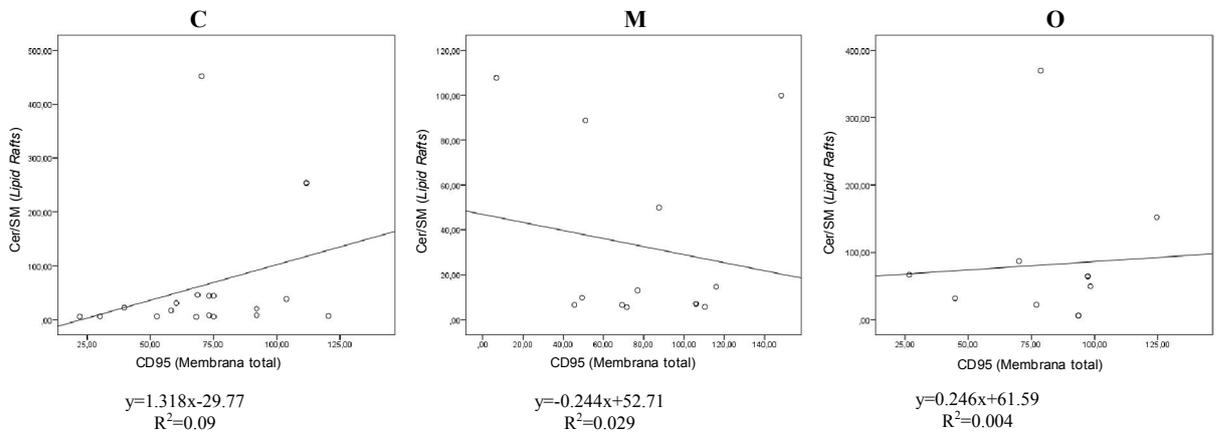
**XIII: Correlación entre los niveles de PUFA de membrana total y Cav1.**



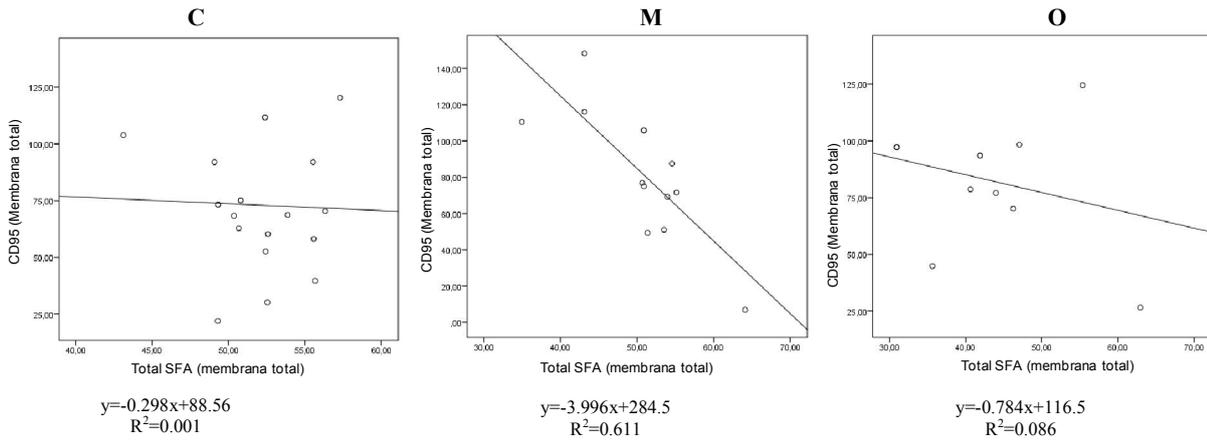
**XIV: Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y ceramida.**



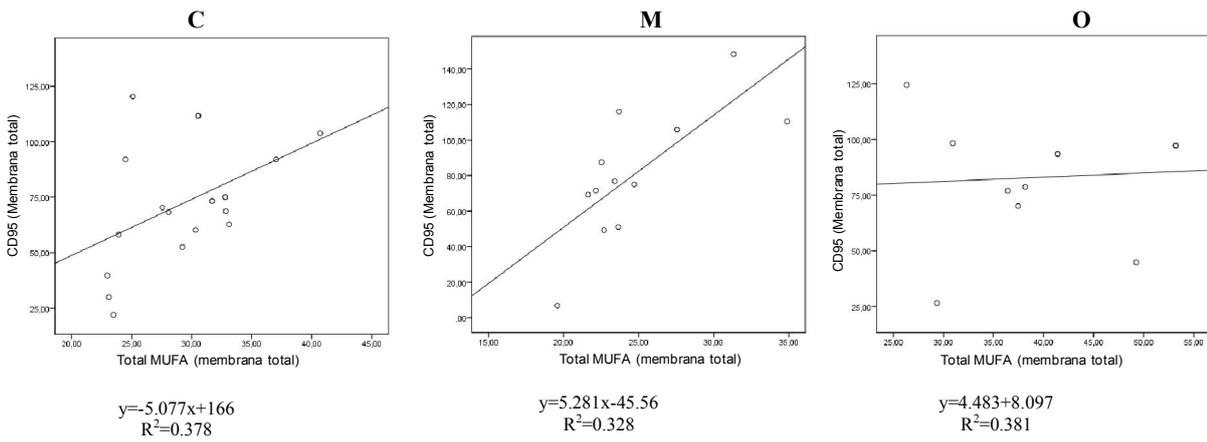
**XV: Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y la ratio Cer/MS.**



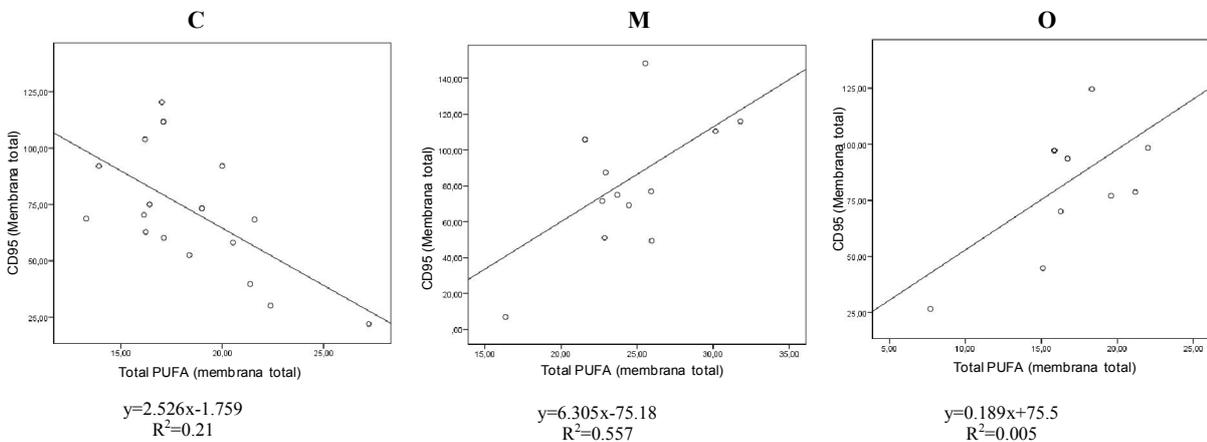
**XVI: Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y SFA de membrana total.**



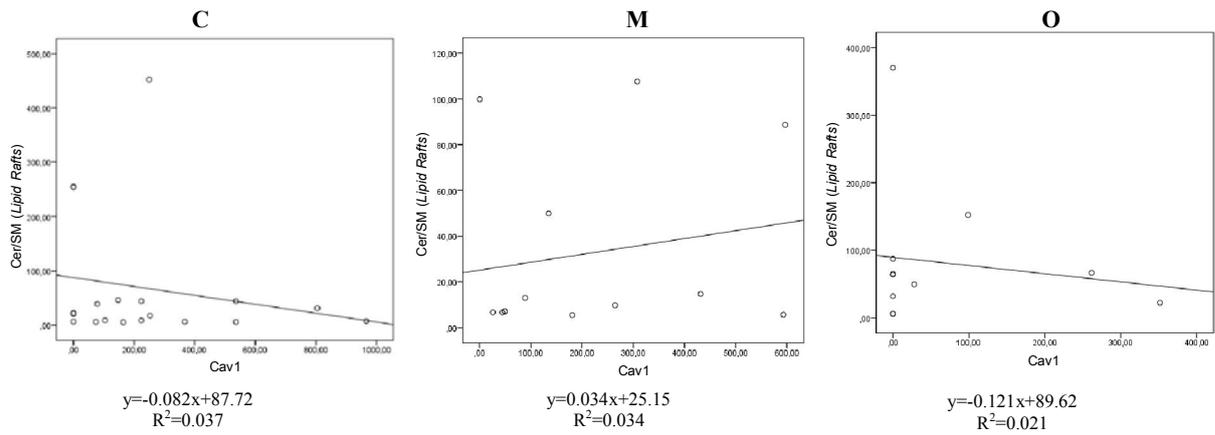
**XVII: Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y MUFA de membrana total.**



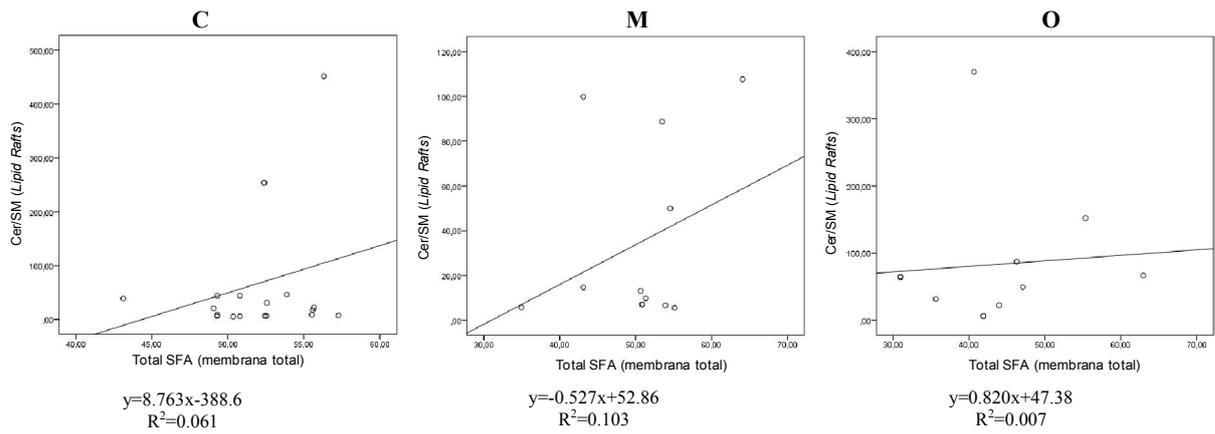
**XVIII: Correlación entre los niveles de CD95 en membrana total y PUFA de membrana total.**



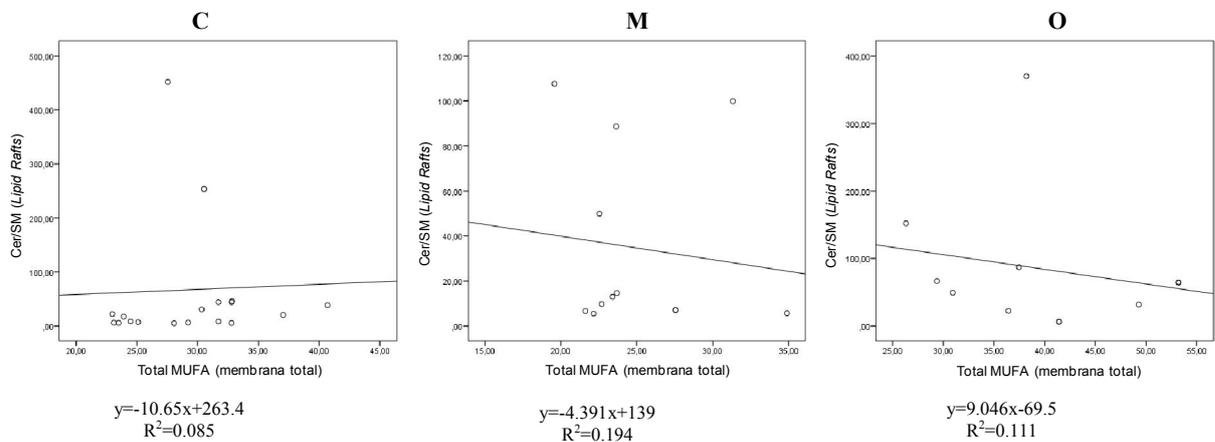
**XIX: Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y Cav1.**



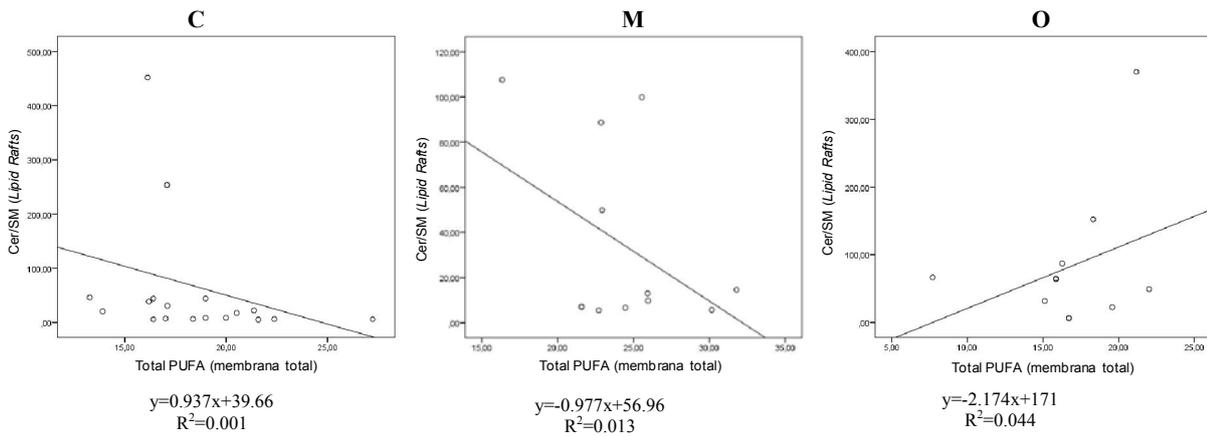
**XX: Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y SFA de membrana total.**



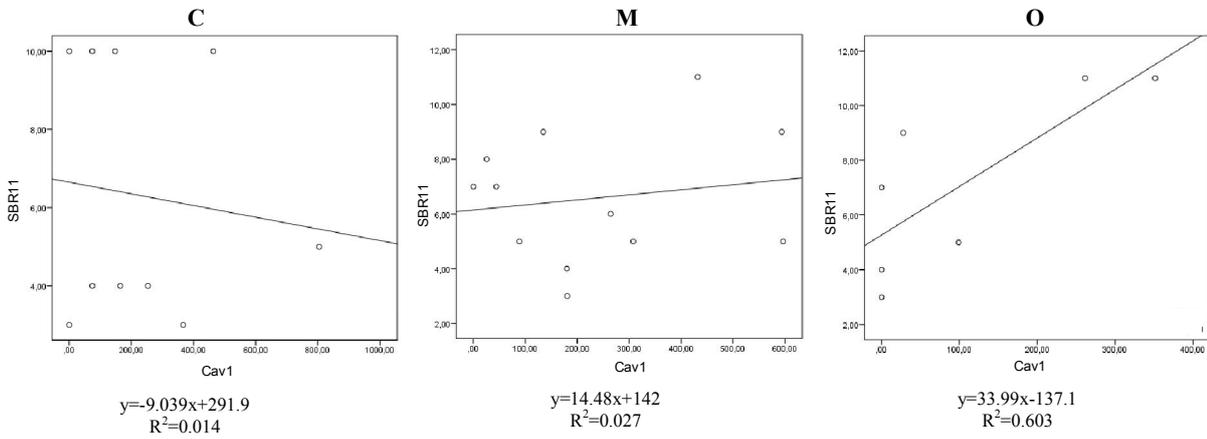
**XXI: Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y MUFA de membrana total.**



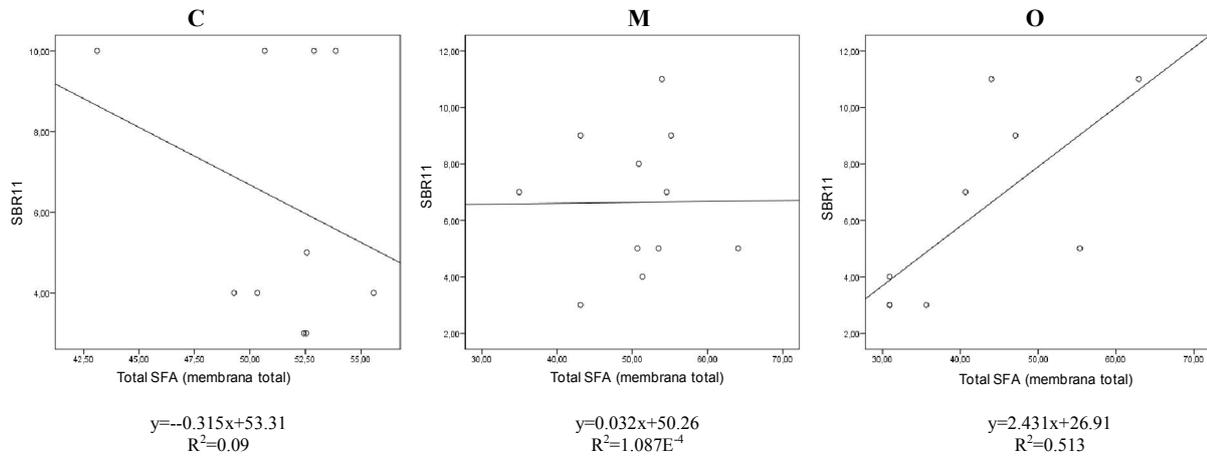
XXII: Correlación entre la ratio Cer/SM en LR y PUFA de membrana total.



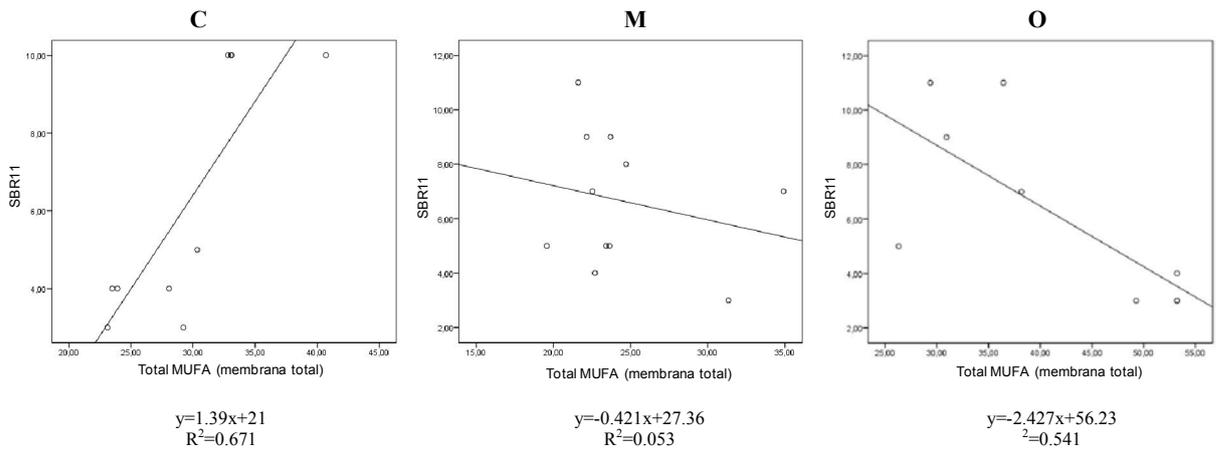
XXIII: Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y Cav1.



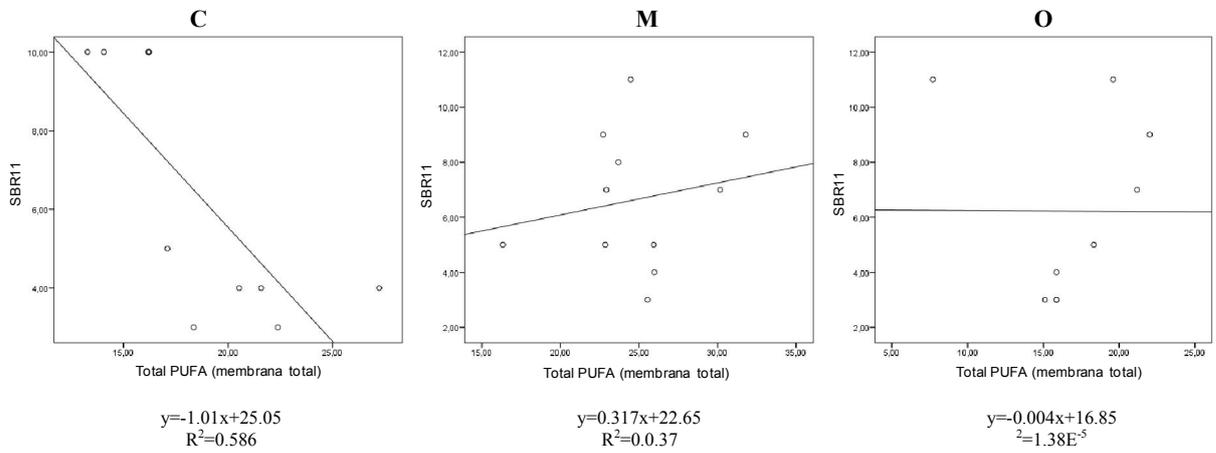
XXIV: Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y SFA de membrana total.



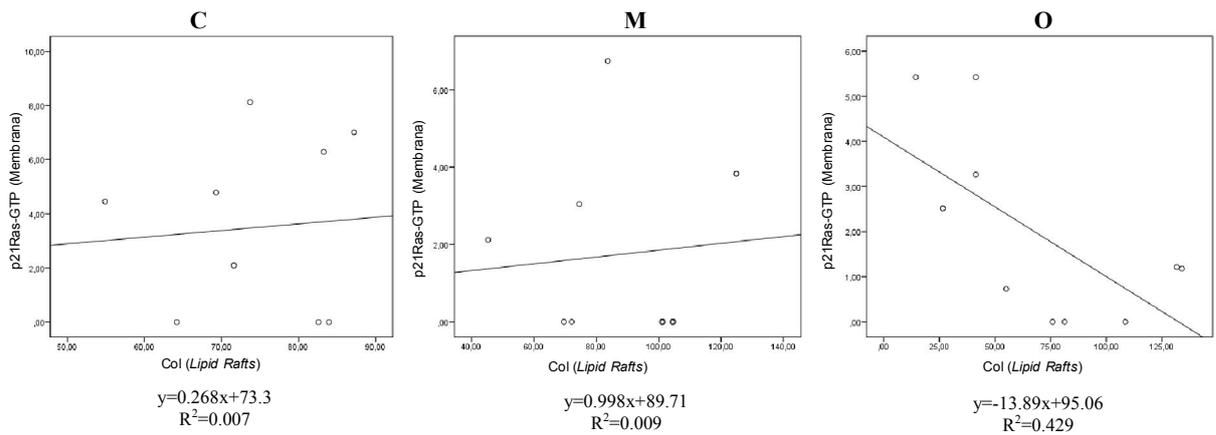
**XXV: Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y MUFA de membrana total**



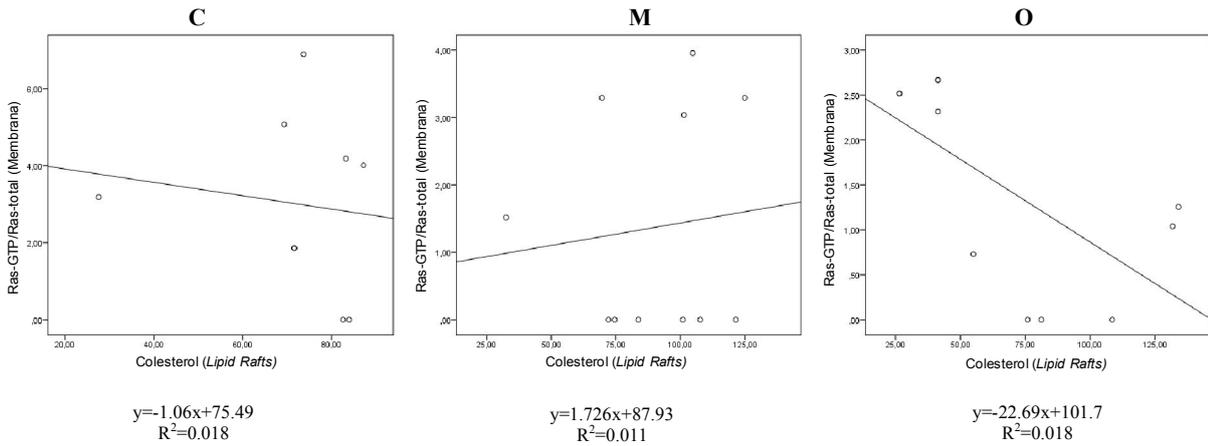
**XXVI: Correlación entre el grado tumoral (SBR11) y PUFA de membrana total**



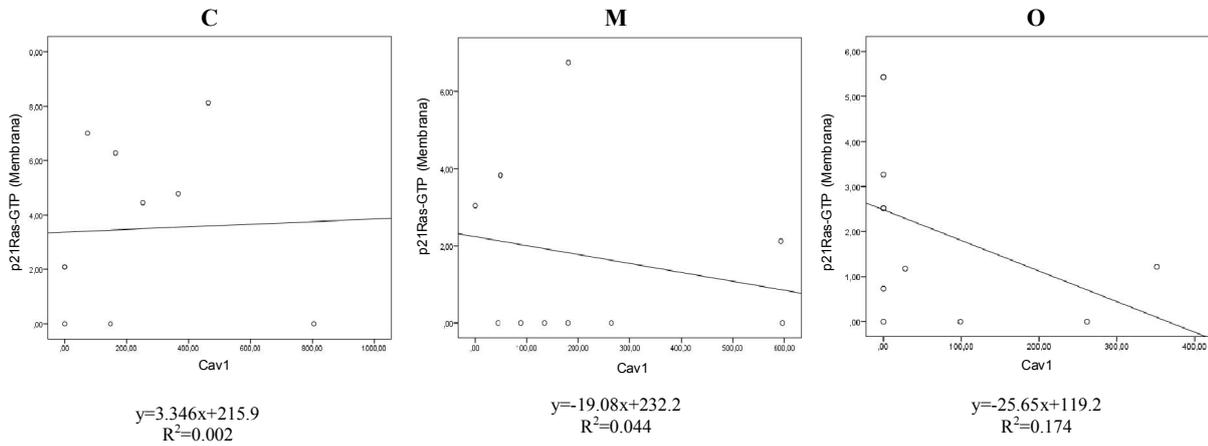
**XXVII: Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y colesterol.**



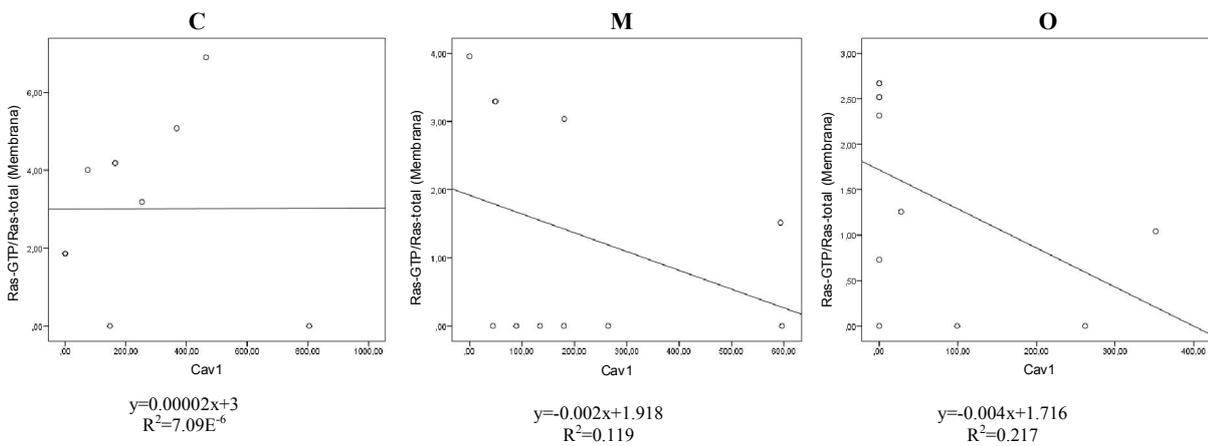
XXVIII: Correlación entre el índice de activación de p21Ras y colesterol.



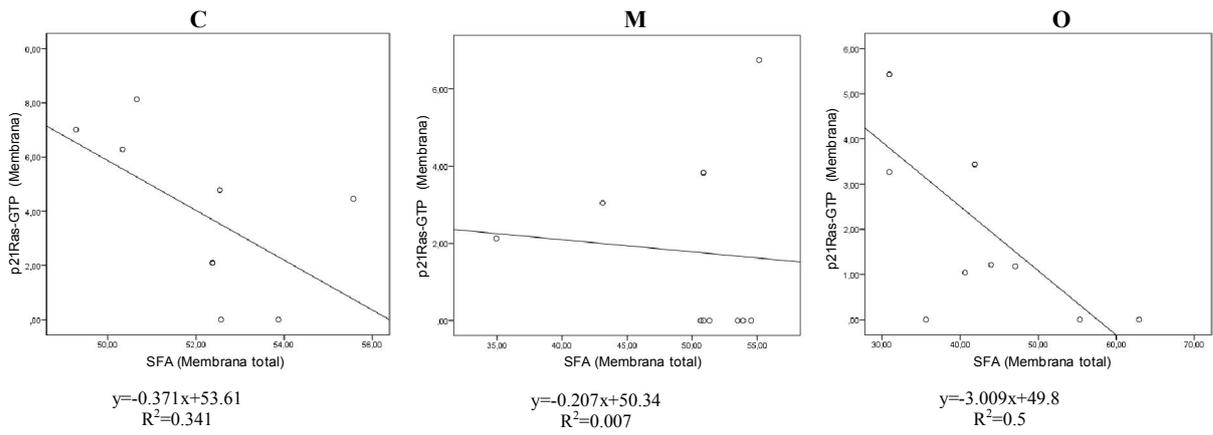
XXIX: Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP Cav1.



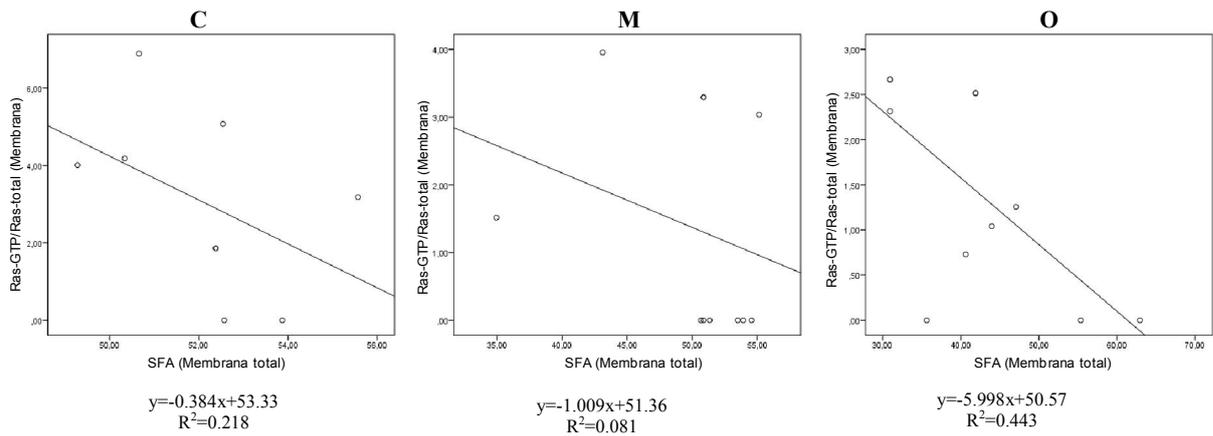
XXX: Correlación entre el índice de activación de p21Ras y Cav1.



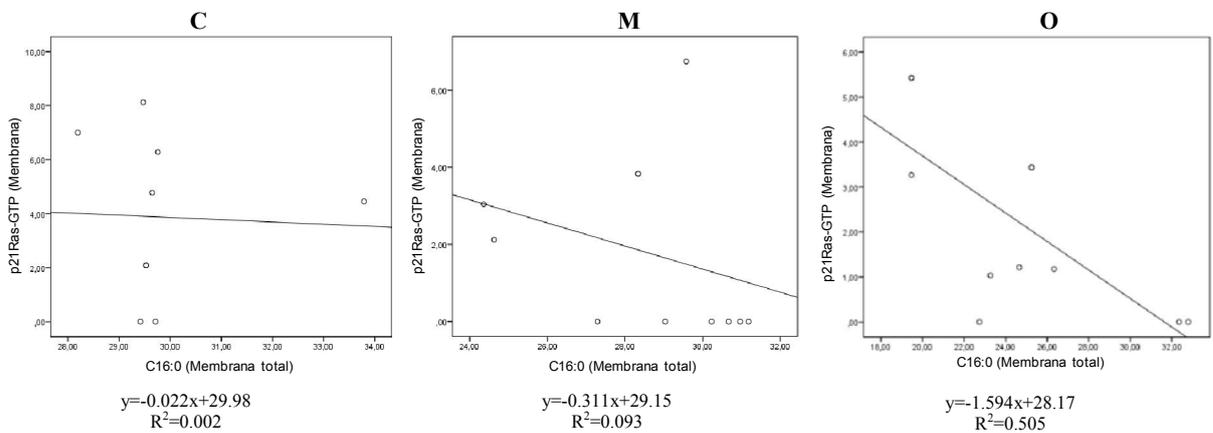
XXXI: Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y SFA de membrana total.



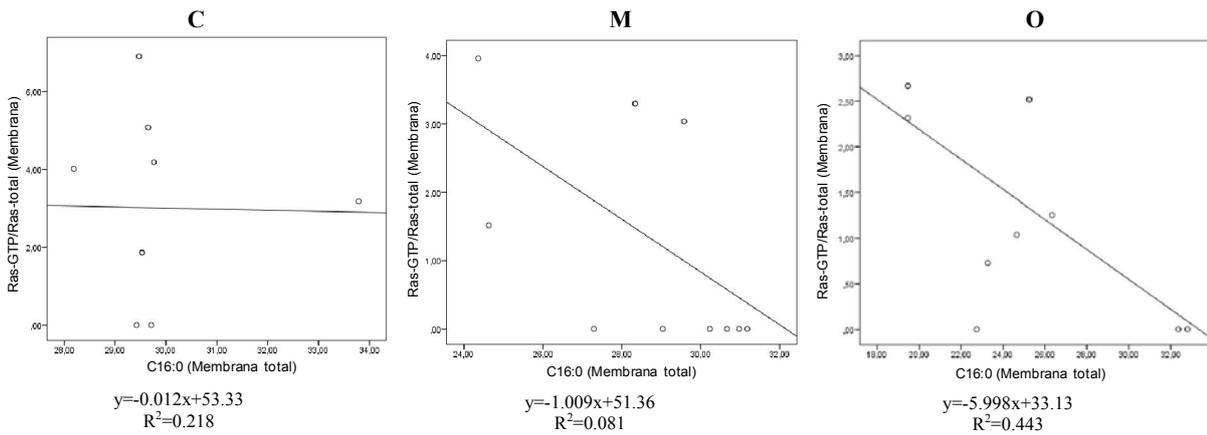
XXXII: Correlación entre el índice de activación de p21Ras SFA de membrana total.



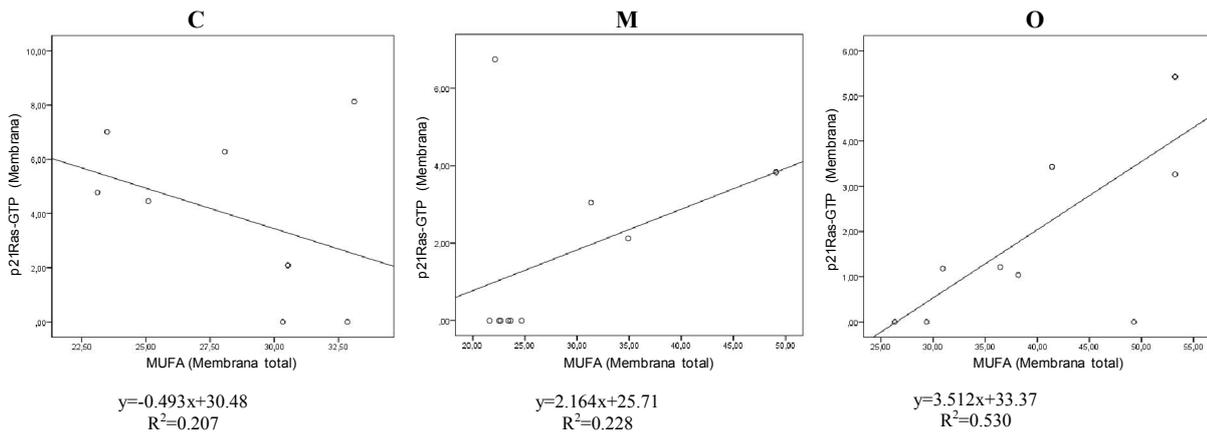
XXXIII: Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y ácido palmítico de membrana total.



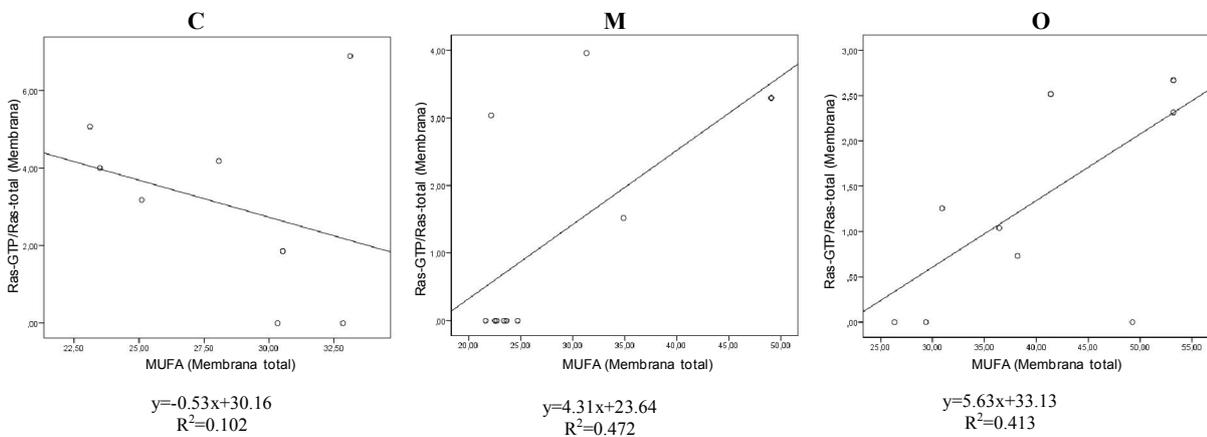
**XXXII: Correlación entre el índice de activación de p21Ras y ácido palmítico de membrana total.**



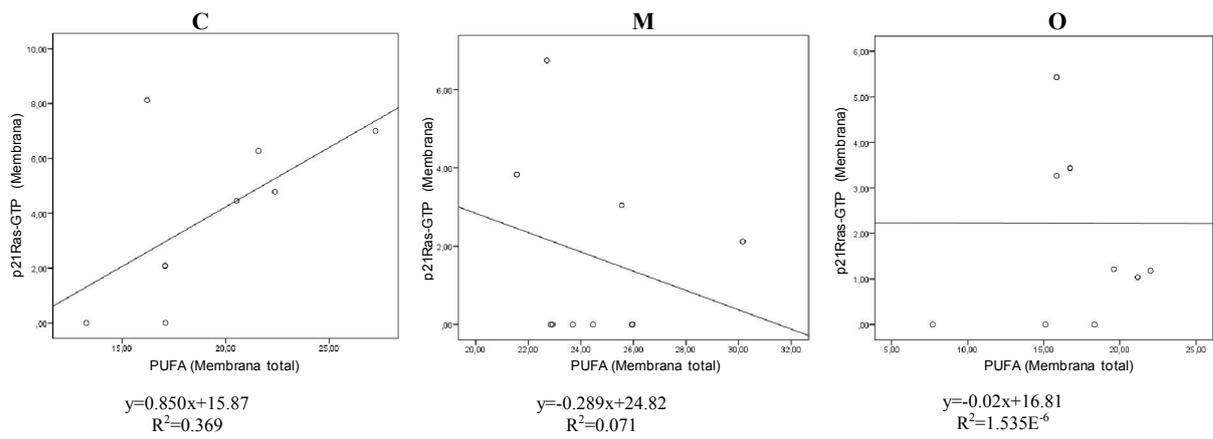
**XXXIII: Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y MUFA de membrana total.**



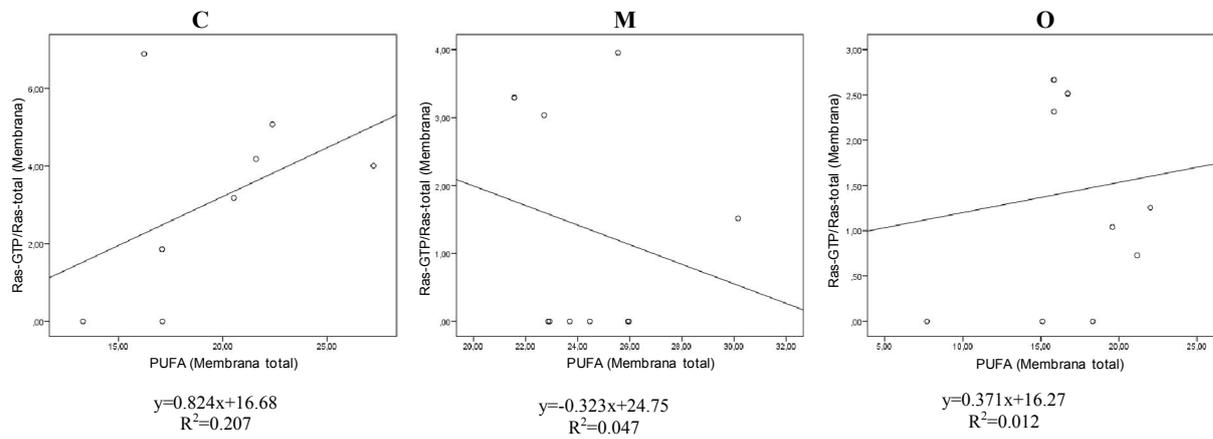
**XXXIV: Correlación entre el índice de activación de p21Ras y MUFA de membrana total.**



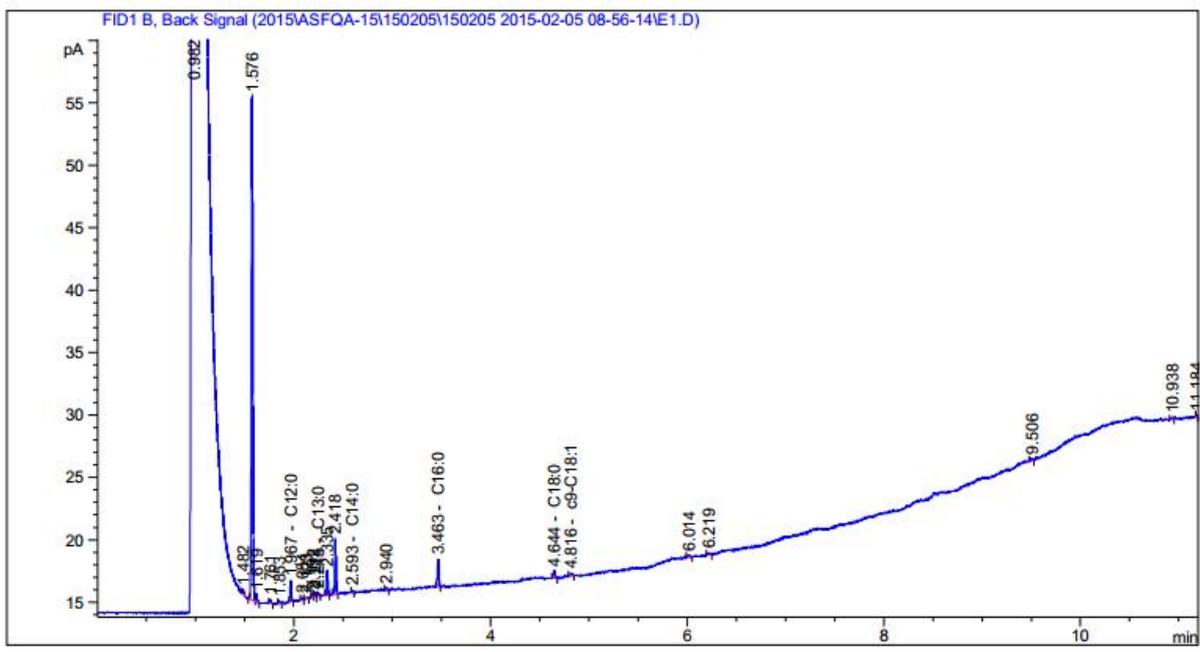
XXXV: Correlación entre los niveles de p21Ras-GTP y PUFA de membrana total.



XXXVI: Correlación entre el índice de activación de p21Ras y PUFA de membrana total.



Anexo Figura 1: Asociación entre parámetros clínicos, bioquímicos y moleculares



Anexo Figura 2: Imagen representativa del cromatograma obtenido en el análisis del contenido en ácidos grasos en LR.



