

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS

ALIMENTOS

FACULTAD DE FARMACIA




“MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA: TERAPIA COMBINADA
DE CITOSTÁTICOS Y COMPUESTOS MINORITARIOS DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN”

TESIS DOCTORAL

SERGIO GRANADOS PRINCIPAL

2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sergio Granados Principal
D.L.: GR. 2748-2008
ISBN: 978-84-691-8250-5

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two lions. The shield is supported by two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing the Latin text: "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP AVG HISPAN REX FVNDATOR".

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte de un proyecto subvencionado por la Excelentísima Diputación de Jaén (2005-2007), un Proyecto CEAS 2007 30.CO.244500 y por el proyecto PI-0210/2007 subvencionado por el Servicio Andaluz de Salud (SAS) de la Junta de Andalucía.

D^a María del Carmen Ramírez Tortosa. Profesor Contratado Doctor de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

D José Luis Quiles Morales. Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Granada.

D César Luis Ramírez Tortosa. F.E.A. de Anatomía Patológica, Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario de Jaen.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Mecanismos moleculares implicados en el tratamiento del cáncer de mama: terapia combinada de quimiotácticos y compuestos minoritarios del aceite de oliva virgen”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el licenciado en Farmacia Sergio Granados Principal y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a veintiocho de Noviembre de dos mil ocho.

Dra. D^a María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. José Luis Quiles Morales

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa



MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. SERGIO GRANADOS PRINCIPAL PARA
ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. Jose Luis Quiles Morales

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa

Ldo. D. Sergio Granados Principal

Granada, 2008



En este preciso instante es cuando comienzo a ver con cierta perspectiva todos estos años que han transcurrido desde mi llegada al centro, tiempo en el que han sucedido multitud de cosas que ni siquiera hubiera podido imaginar. Atrás quedan buenos y malos momentos, aunque personalmente opino que lo mejor está por venir. El balance general de esta etapa de mi vida supera con creces las expectativas que tenía hace ya cuatro años, se dice pronto, cuando aún con el título de licenciado bajo el brazo creía cándidamente que el de la investigación era un mundo de colegas de bata blanca y bolígrafos adornando el bolsillo del pecho, ¿se puede ser más inocente?. Si hay algo que he aprendido en este tiempo es que el refrán popular “El que algo quiere, algo le cuesta”, alcanza en este trabajo (pese a quién le pese, lo es) su máxima expresión, sin embargo, aunque llegar hasta aquí no ha sido precisamente un camino de rosas, ha sido mucho más llevadero gracias a todas y cada una de las personas que he conocido durante el mismo, razón por la cual creo fervientemente que cada palabra de esta tesis encierra el nombre de cada una de ellas, por lo que quiero mostrar mi más profundo y honesto agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho realidad lo que hasta hace unos meses sólo era un sueño:

A mis padres (Luis y Ana) porque han sabido confiar en mí, dejando en mis manos la toma de todas y cada una de las decisiones con respecto a mi futuro, esperando pacientemente la finalización de esta tesis, respirando muy hondo cada vez que llegaba del laboratorio a horas intempestivas, y por supuesto por comprender que esto es más duro de lo que parece. Gracias por haberme brindado unos estudios que os han supuesto una cantidad ingente de sacrificios y quebraderos de cabeza, por hacerme ver las cosas tal y como son, y convertirme en un hombre de provecho. Sin vosotros no habría llegado tan lejos. Os quiero.

A mis hermanos (Ana y Luis) porque sois lo mejor de lo mejor, y aunque estemos separados por cientos de kilómetros sabed que cada día os llevo conmigo (en la cartera tengo vuestras fotos). ¡La de fiestas que nos quedan por delante! Os quiero una barbaridad. No cambiéis.

Esta tesis no hubiese sido nada sin el apoyo diario recibido de Paqui. No hay en la riqueza del lenguaje castellano palabras suficientes para agradecerle la desinteresada e indispensable ayuda, comprensión, y cariño, aguantando carros y carretas por mí (y lo que te queda). La mitad de este jaleo es gracias a ti, te quiero. Gracias también a tus padres (Pepe y Ángeles) porque también me han tenido que aguantar y nunca recibí una mala cara a cambio. A Jose Ángel, Lourdes y a sus churumbeles (Jose Ángel y Francisco), aunque nunca lo he dicho sois parte muy importante en mi vida, además de montar unas fiestas en petit comité que siempre recordaré con cariño. Manolin y Laura, también tenéis culpa de ser como soy. Gracias a todos.

A mis queridísimos directores: Mayca, Pepe y César, vuestro trabajo en mi formación no tiene precio. Muchas gracias por confiar y creer en mí desde el principio, nunca olvidaré los buenos ratos que hemos pasado juntos (y los que aún nos quedan por delante), tanto en el trabajo como fuera de él. Sabed que os tengo mucho aprecio, respeto y admiración, sois unos brillantes investigadores y mejores personas. Os agradezco de corazón que contéis conmigo para muchos de los proyectos que lleváis sobre vuestras espaldas, permitiéndome que os ayude y siempre teniendo en cuenta mi opinión, además de permitirme demostrar lo que valgo. Gracias por todo, y como dirían los hooligans del Liverpool: "You'll never walk alone" (Richard Rodgers).

Como no agradecer este trabajo a Jose Manuel, Loli y Chemita, que aunque estéis lejos nunca os habéis separado emocionalmente de mí, os quiero más de lo que os podéis imaginar. A vosotros Trini y Javi, que ya tenéis vuestra parcelita de cinco plantas y jardín en esta tesis, como os quiero salaos.

A mi familia al completo, especialmente a mis padrinos (Manolo y Carmen), a mis primos Sara, Miguel, Antonio, Manolo y María, a mi abuela Ana y a los que ya no están conmigo (Dolores, Miguel y José).

A todos y cada uno de mis amigos: Lola (gracias por querer tanto a mi hermano), Pedrín (lo nuestro es imposible), LuzMa, Moisés, Nuri, Alex, Carmen, Blanca, Valle, Antonios, Paola, Ramón Coca, María, Isra, Terry, Ana Tequila, Rocío, Mamen, Gerardo,

George, Antonio (Campanillero), Fernando, Raquel, Juan Antonio, Chuzo, Chenko, Tere, Mabel, Almu, Capi, Carlos, Nita, etc. y tantos otros que seguro me dejo en el tintero, perdonadme que me haya olvidado de vosotros. Gracias a todos por estar ahí cuando os he buscado.

A Javi por su enorme trabajo con la portada de esta tesis, sin tus manos sólo sería una portada, ahora es puro arte con el photoshop. Gracias profesor Díaz, espero que siempre sigas estando ahí, y cuida tu salud machote que al final es lo único que nos queda.

A Laura, por todos aquellos malos y muy buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio y con las respectivas tesis, me has ayudado un montón en todo y tu hombro ha sido siempre un buen lugar en el que apoyarme. Es un placer trabajar contigo. Gracias Garru (aún me debes esa copa).

A Patri, que tía más maja y dispuesta siempre para trabajar, que sepas que nunca me olvidaré de los roscones de reyes tan ricos que haces; de ti no me olvido Nuri, contigo simplemente sobran las palabras sobre el cariño que te tengo, pero acostúmbrate a mirar siempre hacia delante y con un grado más de humildad. Gracias a los dos, campeones.

A Julio (Julinho), por tus consejos, buen humor mañanero y por seguir diciendo que tengo fama de no sé qué (siempre nos quedará Paris), y a Pedro (Rajamuertos), eres un tío estupendo que me has hecho pasar unos ratos fantásticos (que se lo digan a mi mano con la “bromita” del agua hirviendo, o el día en que me regalaste un vale para ayudarte con la mudanza, nunca he visto tanto cacharro junto), eres un amigo con el que se puede contar para todo. No cambies el caos que ordena tu vida. Espero que siempre sigamos de coña, porque estamos de broma ¿no?

A Pedro Sánchez Rovira, porque desde el primer momento en que nos conocimos me has tratado como a uno más, demostrando tu humildad y sencillez acompañado en todo momento de una amplia sonrisa. Gracias por el entusiasmo que has mostrado con respecto a esta tesis.

A todos los miembros del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos: Emilio, Antonio Suárez (algún día jugaremos al squash), Trini, Carmen, M^a Carmen, Ignacio, Nama'a (gracias prenda), Mariano, Dolo, Alba, Carola, Belén, Josune, MD, Erika, María, Chiqui, Luis Fontana, Carolina, Sergio, Ángel Gil, Puri, Jesús, Yahira, Silvia, Margarita, María José, Inma, Tere, Magdalena, José Mataix, Juan Llopis, Cris, Elena Planells, Paco Benítez, Concha, etc. además de todos aquellos de los que me he olvidado, perdonadme por ello.

A todo el departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia, por haberme acogido lo mejor que habéis podido. Al final tenéis que reconocer que doy mucho juego, y lo daré en años venideros. Perdonadme que no nombre a ninguno, ya que hay varios miembros que no se dejan conocer y no sé sus nombres, así que lo mejor es que no me pille los dedos. Gracias a todos.

A los miembros de los servicios de limpieza (Sensi, Isa y Lili) y conserjería (Paco, Juan, Manolo, Carlos, Dani) del edificio Fray Luis de Granada, sois la pera, y aunque ya no nos veamos con la misma frecuencia quiero que sepáis que nunca os olvidaré.

A todos aquellos que nunca se han parado a conocerme tal y como soy, con mis defectos y virtudes, que se creen portadores de la verdad sin percibir siquiera que nadie la posee, y por supuesto que juzgan sin mirarse al espejo con un mínimo de humildad. En definitiva a mis “no amigos”, gracias porque lo que no te mata te hace más fuerte.

Al fallecido Juan Antonio Cebrián, periodista y maestro que consiguió engancharme a la historia y a la radio, tu ausencia me ha dolido demasiado. ¡Fuerza y honor!

A las ratitas que han hecho posible que los resultados de esta tesis sean los que son. Muchas gracias por aguantarme a diario sin morderme ni una sola vez, así como por hacer que desarrolle alergia a vuestros epitelios (Rest In Peace).

THE SHOW MUST GO ON!

“Estos son mis principios. Si a usted no le gustan, tengo otros”

(Groucho Marx)

A mis padres y hermanos.

A Paqui.



Índice general

ABREVIATURAS USADAS

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
I.- Teoría del cáncer	3
I.1.- Etapas del proceso carcinogénico	5
I.1.1.- Fase de iniciación	6
I.1.2.- Fase de promoción	9
I.1.3.- Fase de progresión	13
II.- Cáncer de mama	13
II.1.- Situación epidemiológica	13
II.2.- Etiología de la neoplasia mamaria	15
II.3.- Factores de riesgo en la neoplasia mamaria	16
II.3.1.- Factores genéticos y familiares	17
II.3.2.- Factores hormonales y reproductivos	17
II.3.3.- Talla de las mujeres	18
II.3.4.- Estilo de vida	18
II.3.5.- Factores ambientales	19
II.3.6.- Factores clínicos	20
III.- Papel de la dieta en el cáncer de mama	20
III.1.- Factores con asociación negativa	21
III.2.- Factores con asociación positiva	23
III.3.- Lípidos de la dieta y cáncer de mama	23
III.4.- Aceite de oliva y cáncer de mama	26
III.4.1.- Ácido oleico	27
III.4.2.- Escualeno y esteroides	29
III.4.3.- Compuestos fenólicos	30
IV.- Hidroxitirosol	32

IV.1.- Farmacocinética del hidroxitirosol	33
IV.2.- Estudios de toxicidad con hidroxitirosol	35
IV.3.- Hidroxitirosol y salud	36
IV.3.1.- Hidroxitirosol y enfermedad cardiovascular	39
IV.3.2.- Efectos antiinflamatorios y antiagregantes plaquetarios del hidroxitirosol	41
IV.3.3.- El hidroxitirosol como agente antimicrobiano	43
IV.3.4.- Acción anticancerígena del hidroxitirosol	43
V.- Modelos de carcinogénesis mamaria en roedores	47
V.1.- Modelos obtenidos por ingeniería genética	48
V.2.- Modelos no generados por ingeniería genética	50
V.2.1.- Tumorigénesis espontánea	50
V.2.2.- Radiación	51
V.2.3.- Modelos de implantes/trasplantes	52
V.2.4.- Modelos tumorales químicamente inducidos	53
V.2.4.1.- Inducción de cáncer mamario con PhIP	54
V.2.4.2.- Inducción de neoplasia en mama con MNU	54
V.2.4.3.- Modelo de desarrollo tumoral mamario con DMBA	55
V.2.4.3.1.- Farmacocinética del DMBA	56
V.2.4.3.2.- Histopatología de los tumores de mama obtenidos con DMBA	59
V.2.4.4.- Estudios de expresión génica en ratas con cáncer de mama químicamente inducido	61
VI.- Tratamiento del cáncer de mama	65
VI.1.- Cirugía	66
VI.2.- Quimioterapia	67
VI.3.- Radioterapia	69
VI.4.- Terapia hormonal	69
VI.5.- Tratamiento biológico	70
VI.6.- Terapia génica	71
VII.- Adriamicina: mecanismos, toxicidad y terapia preventiva	72
VII.1.- Mecanismos de acción de la adriamicina	73

VII.1.1.- Alteraciones del ADN	74
VII.1.2.- Mecanismos relacionados con los radicales libres	76
VII.2.- Terapia preventiva	78
VII.2.1.- Adriamicina y antioxidantes	79
MATERIAL Y MÉTODOS	
I.- Material	83
I.1.- Aparatos de uso general	83
I.2.- Software específicos	84
I.3.- Material para el estudio anatomopatológico	84
I.4.- Animales de experimentación	86
II.- Métodos	86
II.1.- Modelo experimental de carcinogénesis mamaria	86
II.1.1.- Elección del carcinógeno químico	87
II.1.2.- Modelo de quimioterapia con adriamicina e hidroxitirosol en ratas afectas de cáncer de mama químicamente inducido con DMBA	91
II.1.2.1.- Pretratamiento: administración del carcinógeno químico, desarrollo tumoral e implantación de microchips	92
II.1.2.2.- Tratamiento: tratamiento con adriamicina y/o hidroxitirosol	98
II.1.2.3.- Seguimiento de la evolución de los volúmenes tumorales	100
II.1.2.4.- Parámetros tumorales determinados en cada animal	101
II.2.- Obtención de muestras	101
II.2.1.- Tumores mamarios	101
II.2.2.- Sangre y plasma	103
II.3.- Métodos analíticos	105
II.3.1.- Parámetros bioquímicos plasmáticos	105
II.3.1.1.- Glucosa	106
II.3.1.2.- Proteínas totales	107
II.3.1.3.- Lípidos totales	107
II.3.1.4.- Colesterol	108
II.3.1.5.- Triglicéridos	109

II.3.1.6.- Fosfolípidos	110
II.3.1.7.- Lactato	111
II.3.1.8.- Fosfatasa alcalina	112
II.3.1.9.- Lactato deshidrogenasa	112
II.3.1.10.- Creatina quinasa	113
II.3.1.11.- Alanina aminotransferasa GPT (ALT)	114
II.3.1.12.- Aspartato aminotransferasa GOT (AST)	114
II.3.2.- Parámetros indicadores de estrés oxidativo	115
II.3.2.1.- Cuantificación de retinol, tocoferol y coenzimas Q ₁₀ y Q ₉ mediante HPLC	115
II.3.2.2.- Capacidad antioxidante total del plasma	117
II.3.2.3.- Valoración del daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica: ensayo comet alcalino	118
II.3.3.- Determinación de los niveles de hidroxitirosol y su metabolito alcohol homovanílico	124
II.3.4.- Estudio anatomopatológico: tinción hematoxilina-eosina y tinción inmunohistoquímica (Ki67)	127
II.3.4.1.- Tinción con hematoxilina-eosina	127
II.3.4.2.- Determinación inmunohistoquímica de la proliferación celular mediante el anticuerpo Ki67	129
II.3.5.- Análisis de expresión génica con la plataforma GeneChip [®] de Affimetrix [®] (RAT GENOME 230 2.0 ARRAY)	131
II.3.5.1.- Selección de las muestras	132
II.3.5.2.- Procesamiento de las muestras: extracción y purificación del ARN	132
II.3.5.3.- Síntesis de ARN complementario biotinilado	133
II.3.5.4.- Hibridación y escaneado del RAT GENOME 230 2.0 ARRAY. Análisis de los controles	134
II.3.5.5.- Análisis funcional de las secuencias significativas	136
II.3.6.- Validación de los genes obtenidos del ensayo microarray a través de QRTPCR	137
II.3.6.1.- Placas microfluídicas o arrays de baja densidad de Taqman [®]	138

II.3.6.2.- Selección de los ensayos Taqman	140
II.3.6.3.- Generación de ADNc por transcripción inversa a partir de ARN total	141
II.3.6.4.- Amplificación del ADNc mediante PCR	141
II.4.- Análisis estadístico de los resultados	143
II.4.1.- Análisis estadístico de los parámetros analíticos	143
II.4.2.- Análisis bioinformático del perfil genómico con microarray	144
II.4.3.- Análisis bioinformático de la validación mediante RTPCR	147
 RESULTADOS	
I.- Parámetros bioquímicos plasmáticos	149
II.- Parámetros indicadores de estrés oxidativo	150
II.1.- Capacidad antioxidante total plasmática	150
II.2.- Determinación de la genotoxicidad	150
II.3.- Antioxidantes plasmáticos	151
III.- Niveles plasmáticos de hidroxitirosol y alcohol homovanílico	153
IV.- Parámetros tumorales y pesos de los animales	154
V.- Anatomía patológica de los tumores. Índice proliferativo (Ki67)	158
VI.- Perfil genético mediante microarray	163
VI.1.- Concentración y pureza del ARN y ARNc obtenidos. Control de calidad de la hibridación	163
VI.2.- Análisis bioinformático de los arrays	165
VI.3.- Análisis funcional de las secuencias significativas	170
VI.3.1.- Grupo HT	170
VI.3.2.- Grupo DMBA	178
VI.3.3.- Grupo ADR	185
VI.4.- Genes seleccionados para su validación	189
VII.- Validación mediante RTPCR cuantitativa de las secuencias significativas obtenidas por microarray	192
VII.1.- Análisis bioinformático de las secuencias seleccionadas	192
VII.2.- Secuencias seleccionadas en cada grupo de estudio	197

DISCUSIÓN

I.- Parámetros bioquímicos plasmáticos	205
II.- Indicadores de estrés oxidativo	205
III.- Cuantificación plasmática de hidroxitirosol y alcohol homovanílico	207
IV.- Efectos del hidroxitirosol sobre el crecimiento tumoral	208
V.- Estudio de perfil génico: genes validados mediante RTPCR	210
V.1.- Genes validados en el grupo hidroxitirosol	210
V.2.- Resumen de la hipótesis sobre el mecanismo de acción antitumoral del hidroxitirosol	232
V.3.- Genes confirmados en el grupo adriamicina	237
V.4.- Genes confirmados en el grupo DMBA	247

CONCLUSIONES	255
--------------	-----

RESUMEN	257
---------	-----

PERSPECTIVAS	261
--------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	263
--------------	-----

ΔDO: incremento de densidad óptica.

***NO:** óxido nítrico.

***NO₂:** dióxido de nitrógeno.

12-OHM-7-MBA: 12-hidroximetil-7-metilbenzo(α)antraceno.

¹O₂: oxígeno singlete.

4ABP: 4-aminobiphenyl.

5- y 12-LOX: 5- y 12-lipooxigenasa.

5-OH-MeUra: 5-hidroximetil-uracilo.

7-OHM-12-DMBA: 7-hidroximetil-12-metilbenzo(α)antraceno.

8-OHdG: 8-hidroxi-deoxiguanosina.

A

A:T: adenina:timina.

AA: ácido araquidónico.

AcH: ácido homovanílico.

AD9: adenovirus tipo 9 en la glándula mamaria.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ADP: adenosina difosfato.

ADR: adriamicina.

ADR+HT: adriamicina + hidroxitirosol.

ADRA2A: adrenergic receptor, alpha 2a.

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados.

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

AH: alcohol homovanílico.

AHA: American Health Association.

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog-1 (proteína kinasa B).

ALAS2: aminolevulinic acid synthase 2, erythroid.

ALP: fosfatasa alcalina.

ALT: alanina aminotransferasa.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

ANGPTL4: angiopoietin-like 4.

ANXA1: annexin A1.

AP-1: activator protein-1.

APBB3: amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNc: ácido ribonucleico complementario.

ARNm: ARN mensajero.

ARNsi: small-interfering RNA.

ASF/SF2: splicing factor, arginine/serine-rich.

AST: aspartato aminotransferasa.

ATF: activating transcription factor.

ATM: ataxia telangiectasia mutated homolog.

ATP: adenosina trifosfato.

B

Bad: Bcl2-antagonist of cell death.

BAG: Biopsia con Aguja Gruesa.

Bak: bcl2-antagonist/killer 1.

Bax: bcl2-associated X protein.

Bcl2: B-cell CLL/lymphoma 2.

Bcl-xL: BCL2-like 1.

Bcl-xs: bcl2-like 1.

bFGF: basic fibroblast growth factor.

BRCA1: breast cancer-1.

BRCA2: breast cancer-2.

BRIP1: BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1.

BSGC: Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela.

Btc: betacellulin.

C

C:G: citosina:guanina.

CABC1: ABC1 activity of bc1 complex homolog (S. pombe).

CAR11: carbonic anhydrase 11.

CCNL2: cyclin L2.

CDC25B: cell division cycle 25 homolog B (S. pombe).

CDC42: cell division cycle 42.

CDH1: cadherin-1.

CDK: cyclin-dependent kinase.

CDK: quinasas dependientes de ciclinas.

c-fos: c-fos oncogene.

CG/EM: cromatografía gaseosa-espectrometría de masas.

CGA: campo de gran aumento.

CHE: Colesterol esterasa.

CHEK2: checkpoint-like protein CHK2.

CHO: colina oxidasa.

CHOD: Colesterol oxidasa.

CIMA: centro de investigación médica aplicada.

c-jun: jun oncogene.

CMA1: chymase 1, mast cell.

c-Myc: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog.

CNKSR1: connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1.

CO: colesterol.

COMT: catecol-O-metiltransferasa.

CoQ₁₀: coenzima Q₁₀.

COX-2: ciclooxigenasa-2.

CpG: dinucleótidos de citosina-fosfato de guanina.

CQ: creatina quinasa.

CREB: cAMP Response element binding protein.

CRYAB: α BCrystallin.

C_T: threshold cycle (umbral del ciclo).

CTSD: cathepsin D.

CYP19: aromatasa.

CK: creatinina kinasa.

Cdkn1a: p21^{waf}.

CPT1A: carnitine palmitoyltransferase 1A.

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A.

C4.4a: GPI-anchored metastasis-associated protein homolog.

D

DAP: dihidroxiacetona fosfato.

DHA: ácido docosahexanoico.

DHPA: ácido dihidroxifenilacético.

DMBA: dimetilbenzo(α)antraceno.

DO: densidad óptica.

DOc: densidad óptica corregida.

DTD: DT-diaforasa.

E

E2F: E2F transcription factor.

EGF: epidermal growth factor.

EGFR: epidermal growth factor receptor.

EGR3: early growth response 3.

EPA: ácido eicosapentanoico.

ERK: extracellular regulated MAP kinase.

ERN: especies reactivas del nitrógeno.

ERO: especies reactivas del oxígeno.

ER α : estrogen receptor alpha.

F

FADS1: fatty acid desaturase 1.

FapyAde: 4,6-diamino-5-formamino-piridina.

FAS: fatty acid synthase.

FASL: ligando de unión al receptor de muerte Fas/CD95.

FBX4: -box protein 4.

FC: fold change entre condiciones.

FGF: fibroblast growth factor.

FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1.

FGFR2: fibroblast growth factor receptor 2.

FISH: fluoresce in situ hibridation.

FosB: Fos-B oncogene.

FRA: fos-like antigen.

FTL4: FMS-like tyrosine kinase 4.

G

G3P: glicerol-3-fosfato.

G6P-DH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

GABA: gamma-aminobutyric acid.

GABBR1: gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1.

GATA: transcription factor GATA.

GCLC: glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit.

GGT: γ -glutamyltranspeptidasa.

GIT2: G protein-coupled receptor kinase-interactor 2.

GLOA: globin alpha.

GMPc: guanosín monofosfato cíclico.

GOD: glucosa oxidasa.

GOT: transaminasa glutamato oxalacética.

GPO: glicerol-3-oxidasa.

GPT: transaminasa glutámico pirúvica.

GQ: glicerol quinasa.

GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 beta.

GST: glutatión-S-transferasa.

H

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HBA-A1: hemoglobin alpha, adult chain 1.

HBB: hemoglobin, beta.

HB-EGF: heparin-binding epidermal - growth factor.

HDL: lipoproteína de alta densidad.

HIF-1: hypoxia inducible factor-1.

HMG-CoA: hidroximetilglutaril-CoA reductasa.

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

HO[•]: radical hidroxilo.

HO₂[•]: radical hidropéroxido.

HPLC: cromatografía líquida de alta presión.

HQ: hexoquinasa.

H-ras-1: harvey rat sarcoma virus oncogene 1.

Hsp27: heat shock protein 27.

HT: hidroxitirosol.

I

i.g: vía intragástrica.

i.p: vía intraperitoneal.

IARC: international agency for research on cancer.

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1.

ID1: inhibitor of DNA binding 1.

IER3: immediate early response 3.

IFN γ : interferon gamma.

IGF: insulin-like growth factor.

IGFBP: insulin-like growth factor binding protein.

IL-1: interleukin 1.

IL10: interleukin 10.

IL-2: interleukin 2.

IL3: interleukin 3.

IL6: interleukin 6.

IL6R: interleukin 6 receptor.

IL6Rs: soluble/secreted IL6R.

IL6ST: interleukine 6 signal transducer.

IMIM: Instituto Municipal de Investigación Médica.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

Ire1: endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1.

IRF-1: interferon regulatory factor-1.

IRS1: insulin receptor substrate 1.

J

JNK: c-jun N-terminal kinase.

JunB: Jun-B oncogene.

JunD: Jun D proto-oncogene.

K

KITL: kit ligand.

Kng1: kininogen 1.

L

LDH: lactato deshidrogenasa.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LGMD-2C: limb-girdle muscular dystrophy.

LHRH: Luteinizing hormone-releasing hormone.

LIMK2: LIM domain kinase 2.

LO: lactato oxidasa.

LPO: lipoprotein lipasa.

LTC4S: leukotriene C4 synthase.

M

MAPK: mitogen activated protein kinase.

MAX: myc associated factor X.

MCA: 3-metilcolantreno.

MCA32: mast cell antigen 32.

MDA: malondialdehído.

MDA-7: melanoma differentiation association protein 7.

MDH: malato deshidrogenasa.

Mdm-2: Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse).

MDR-1: Multidrug resistance-1.

MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalina.

Met/Met: metionina/metionina.

MMP: matrix metalloproteinase.

MMTV: mouse mammary tumors virus.

MNT: max binding protein.

MNU: N-metil-nitrosourea.

monoHER: 7-monohidroxietylrutósido.

MRP: multidrug resistance protein.

MYH9: myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle.

N

NBS1: Nijmegen breakage síndrome-1.

NCBI: national center for biotechnology information.

NEXN: nexilin.

NFk β : nuclear factor kappa beta.

NHN1: conserved nuclear protein Nhn1.

NK: natural killer.

NKG2D: NK cell receptor D.

NMI: N-myc (and STAT) interactor.

NNAT: neuronatin.

NOS: Not Otherwise Specified.

NOTCH4: Notch homolog 4.

Nox-4: NADPH oxidase 4.

NPY: neuropeptide Y.

NUSE: error estándar no escalado normalizado.

O

O/g: vía oral/gavage.

O: vía oral.

O₂^{•-}: anión superóxido.

ONOO⁻: peroxinitrito.

ONOOCO₂⁻: nitroperoxicarbonato.

P

p,p'DDE: diclorofenildicloroetileno.

p,p'DDT: 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano.

p14: CDKN2A (ARF).

p16: CDKN2A (INK4A).

p21^{waf}: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A.

p27: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B.

p38: p38 MAP kinase.

p53: p53 tumor suppressor.

PALB2: partner and localizer of BRCA2.

PARP1: poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1.

PCA: análisis de componentes principales.

PCDHA4: protocadherin alpha 4.

PCNA: proliferating cell nuclear antigen.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: platelet derived growth factor.

PDGFA: platelet derived growth factor alpha.

PDGFRA: platelet derived growth factor receptor alpha.

PEA-3: polyomavirus enhancer activator-3.

PER2: period homolog 2 (Drosophila).

PGE₂: prostaglandina E₂.

PGR: progesterone receptor.

PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina.

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase.

PKC: proteína quinasa C.

PL: fosfolípidos

POD: peroxidasa.

PPAR: peroxisome proliferator activated receptor.

PTEN: phosphatase and tensin homolog.

R

Rac-1: ras-related C3 botulinum toxin substrate-1.

RAD50: DNA repair protein Rad50.

Ras: Ras oncogene.

Rb: retinoblastoma.

RMA: robust multichip average.

RNPS1: ribonucleic acid binding protein S1.

RTPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

S

S100A9: S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B).

SD: Sprague-Dawley.

SFRP4: secreted frizzled related protein 4.

SGCG: sarcoglycan, gamma (dystrophin-associated glycoprotein).

SLC6A4: solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4).

SNF1LK: SNF1-like kinase.

SQLE: squalene epoxidase.

Src: Src oncogene.

STAT-1 α : signal transducer and activator of transcription-1 alpha.

STK11: serine/threonine kinase 11.

SULT1A1: sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member-1.

SV40: simian virus 40.

T

TAC: capacidad antioxidante total plasmática.

TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.

TCDD: tetraclorodioxina.

TEF: thyrotroph embryonic factor.

TG: triglicéridos.

TGF β : transforming growth factor beta.

TGF- β : transforming growth factor beta.

THRSP: thyroid hormone responsive protein.

TNFRSF6/FAS/CD95: TNF receptor superfamily, member 6.

TNF α : tumor necrosis factor alpha.

TOP2A: topoisomerase 2a.

TP53: tumor protein p53.

TPSAB1: tryptase alpha/beta 1.

TRAIL: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10.

TSHB: thyroid stimulating hormone, beta.

TUBA1: α 1tubulina.

U

U/L: unidades internacionales por litro.

uPA: plasminogen activator, urokinase.

V

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1.

VDUP1: vitamin D₃-upregulated protein.

VEGF: vascular endothelial growth factor.

VEGFD: vascular endothelial growth factor D.

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad.

W

WAP: whey acidic protein.

WHO: world health organisation.

Wnt: wingless-type MMTV integration site family.

X

XRCC3: DNA repair protein XRCC3.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del ácido oleico	28
Figura 2. Estructura molecular del escualeno	29
Figura 3. Estructuras moleculares de los alcoholes fenólicos hidroxitirosol y tirosol, y del secoiridoide oleuropeína	31
Figura 4. Procedencia del hidroxitirosol a partir de oleuropeína	32
Figura 5. Mecanismos moleculares implicados en el ciclo celular	45
Figura 6. Esquema simplificado que representa las principales vías de metabolismo del DMBA	58
Figura 7. Sistema de radioterapia MammoSite®	69
Figura 8. Mecanismos de producción de ERO/ERN inducidos por la adriamicina	77

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las lesiones mamarias de ratas y su correlación con las lesiones humanas	60
---	----

MATERIAL Y MÉTODOS

FIGURAS

Figura 1. Imagen del mantenimiento de los animales	86
Figura 2. Modelo de DMBA para la elección del carcinógeno químico	89
Figura 3. Modelo de MNU para la elección del carcinógeno químico	89
Figura 4. Diferentes tipos de agujas de gavage	93
Figura 5. Radiografía tomada a un roedor con una aguja de gavage introducida	93
Figura 6. Sistema de implantación y lectura de microchips	95
Figura 7. Sistema Trucut para toma de biopsias	97
Figura 8. Esquema simplificado del tratamiento con adriamicina	99

Figura 9. Esquema simplificado del tratamiento semanal con hidroxitirosol	100
Figura 10. Fotografía tomada a un tumor mamario durante el sacrificio. Aparece el código del animal abajo a la derecha	102
Figura 11. Corte del tumor de la figura 10 tras su fijación en formaldehído	102
Figura 12. Secuencia de imágenes de la canulación de la arteria aorta abdominal	104
Figura 13. Microplaca estándar de 96 pocillos	106
Figura 14. Clasificación de los tipos de cometas en función del daño en el ADN	121
Figura 15. Comprobación de los ARN purificados por electroforesis en gel de agarosa	133
Figura 16. Chequeo de los ARNc purificados por electroforesis en gel de agarosa	133
Figura 17. Comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa de los ARNc fragmentados	134
Figura 18. Imagen correspondiente a una tarjeta microfluídica de 384 pocillos de Applied Biosystems	137
Figura 19. Esquema que representa la reacción de la nucleasa 5'	138
Figura 20. Detalle de los reservorios y pocillos de una tarjeta microfluídica	139
Figura 21. Detalle de la carga de mezcla de reacción PCR con ADNc en su correspondiente reservorio de una tarjeta microfluídica	142

TABLAS

Tabla 1. Modelos de carcinogénesis mamaria DMBA-inducidos: estudios en ratas	87
Tabla 2. Modelos de carcinogénesis mamaria MNU-inducidos: estudios en ratas	88
Tabla 3. Volúmenes tumorales totales/rata del estudio de elección del carcinógeno: grupo DMBA	90
Tabla 4. Resumen del protocolo de inmunotinción para Ki67	130

RESULTADOS

FIGURAS

Figura 1. Capacidad antioxidante total en plasma	150
Figura 2. Daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica	151
Figura 3. Concentración de hidroxitirosol y alcohol homovanílico en plasma	154
Figura 4. Peso de los animales	155
Figura 5. Multiplicidad tumoral	156
Figura 6. Volumen del tumor trucut	157
Figura 7. Volumen tumoral total	158
Figura 8. Morfologías cribiforme (A), papilar (B) y sólido (C), vistas a 10, 10 y 40 aumentos, respectivamente. Tinción de hematoxilina-eosina	161
Figura 9. Proliferación celular	162
Figura 10. Inmunotinción para Ki67 (40X)	162
Figura 11. Gráfica NUSE representando el error estándar de cada sonda en cada chip	166
Figura 12. Clúster jerárquico bidimensional de muestras realizado a partir de la lista de trabajo GENERAL. Ensayo de microarray	168
Figura 13. Clúster jerárquico bidimensional de muestras a tiempo INICIO (A) y FINAL (B) realizado a partir de las respectivas lista de trabajo (4444 y 7127 sondas respectivamente). Ensayo de microarray	169
Figura 14. Clúster jerárquico bidimensional de muestras a tiempo INICIO (A) y FINAL (B) realizado a partir de las secuencias significativas (88 y 110 sondas respectivamente). Ensayo de microarray	170
Figura 15. Esquema simplificado de los procesos biológicos (según PANTHER) en que se clasifican los genes seleccionados para el grupo HT	172
Figura 16. Esquema simplificado de los procesos biológicos (según PANTHER) en que se clasifican los genes seleccionados para el grupo DMBA	180

Figura 17. Esquema simplificado de los procesos biológicos (según PANTHER) en que se clasifican los genes seleccionados para el grupo ADR	186
Figura 18. Dos visiones de PCA (Análisis de Componentes Principales) realizadas a partir de los datos normalizados (178 genes). Ensayo RTPCR	193
Figura 19. Clúster jerárquico de muestras realizado a partir de los datos normalizados. Ensayo RTPCR	194
Figura 20. Dos visiones de PCA realizadas a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Inicio (20 genes). Ensayo RTPCR	195
Figura 21. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Inicio (20 genes). Ensayo RTPCR	195
Figura 22. Dos visiones de PCA realizadas a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Final (16 genes). Ensayo RTPCR	196
Figura 23. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Final (16 genes). Ensayo RTPCR	197
Figura 24. Estudio comparativo de los niveles de expresión detectados por microarray y confirmados usando RTPCR en el grupo hidroxitirosol	199
Figura 25. Estudio comparativo de los niveles de expresión detectados por microarray y confirmados usando RTPCR en el grupo DMBA	201
Figura 26. Estudio comparativo de los niveles de expresión detectados por microarray y confirmados usando RTPCR en el grupo adriamicina	203

TABLAS

Tabla 1. Parámetros bioquímicos en plasma de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con doxorrubicina y/o hidroxitirosol	149
Tabla 2. Antioxidantes en plasma de ratas con cáncer de mama experimental con adriamicina y/o hidroxitirosol	152
Tabla 3. Estudio anatomopatológico de los tumores de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con doxorrubicina y/o hidroxitirosol	159

Tabla 4. Grado de Bloom-Richardson del tumor Trucut de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con adriamicina y/o hidroxitirosol	159
Tabla 5. Clasificación morfológica del tumor Trucut de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con doxorubicina y/o hidroxitirosol	160
Tabla 6. Medida de la concentración y pureza del ARN extraído	164
Tabla 7. Medida de la concentración y pureza de los ARNc sintetizados	164
Tabla 8. Valores de los parámetros de calidad para cada uno de los chips analizados	165
Tabla 9. Valores en porcentaje de los parámetros indicadores de la calidad de los datos en los arrays	166
Tabla 10. Número de secuencias seleccionadas en cada condición y tiempo experimental	167
Tabla 11. Número de secuencias de las listas de trabajo	167
Tabla 12. Análisis funcional de los genes del grupo hidroxitirosol procedentes del microarray según su proceso biológico (DAVID)	171
Tabla 13. Genes del grupo hidroxitirosol implicados en algunos procesos biológicos (PANTHER)	173
Tabla 14. Análisis funcional de los genes de DMBA procedentes del microarray según su proceso biológico (DAVID)	179
Tabla 15. Genes grupo DMBA implicados en algunos procesos biológicos (PANTHER)	180
Tabla 16. Análisis funcional de los genes del grupo adriamicina procedentes del microarray según su proceso biológico (DAVID)	185
Tabla 17. Genes del grupo de adriamicina implicados en algunos procesos biológicos (PANTHER)	186
Tabla 18. Genes procedentes del microarray seleccionados para su validación	189
Tabla 19. Valores de expresión de los genes validados en el grupo hidroxitirosol comparados con DMBA y adriamicina	198
Tabla 20. Valores de expresión de los genes validados en el grupo DMBA comparados con los de los grupos hidroxitirosol y adriamicina	200

Tabla 21. Valores de expresión de los genes validados en el grupo de adriamicina comparado con los grupos hidroxitirosol y DMBA	201
--	-----

DISCUSIÓN

FIGURA

Figura 1. Rutas moleculares implicadas en la hipótesis sobre el mecanismo de acción antitumoral del hidroxitirosol	236
---	-----

A decorative horizontal graphic featuring various scientific and biological motifs. On the left, there is a branch with olives, a flask, and a beaker. In the center, there are clusters of blue spheres and a larger, textured spherical structure. On the right, there are faint outlines of a microscope and a DNA double helix. The entire graphic is rendered in shades of blue and purple.

Justificación y objetivos

I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

El aceite de oliva virgen contiene en su fracción minoritaria diversas sustancias algunas de las cuales presentan una alta actividad biológica, entre las que se incluye su capacidad antioxidante. Nuestro grupo de investigación ha descrito que entre otros, uno de los mecanismos de actuación de dichas sustancias es la inhibición en la producción de radicales libres en situaciones de estrés oxidativo, tales como las que se presentan en las enfermedades cardiovasculares, cáncer o diversas situaciones fisiológicas (al nacimiento, durante la práctica deportiva así como en el proceso de envejecimiento).

La adriamicina, agente empleado en la quimioterapia del cáncer y objeto del presente estudio, cuenta entre sus mecanismos de acción la generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, la potenciación de los procesos apoptóticos y otros. Estos procesos conforman una herramienta eficaz para la eliminación de las células malignas, pero como parte de sus efectos secundarios se genera una alta toxicidad debido al daño producido a células sanas. Esta toxicidad es en sí misma un factor que condiciona de forma severa la dosis y tiempo de aplicación de la misma.

En base a lo anterior, pensamos que existe la posibilidad de que el hidroxitirosol, un potente antioxidante procedente del aceite de oliva virgen, ejerza alguna acción sobre los efectos secundarios de la adriamicina en el tratamiento del cáncer de mama. Tales acciones podrían estar relacionadas con una reducción de los efectos tóxicos de la adriamicina, con modificaciones en su capacidad antitumoral, o bien con una combinación de ambos efectos. La anterior, se trata de una idea que está comenzando a extenderse entre la comunidad científica no sin controversia. Las dudas surgen del hecho de que ciertas sustancias reducen los efectos tóxicos derivados de la quimioterapia a veces en detrimento de su potencial antitumoral. Tal aspecto poco deseable se achaca en numerosas ocasiones a la reducción del estrés oxidativo que genera los fármacos empleados en la terapia anticancerígena, si bien este punto de vista hay que tomarlo con reservas puesto que la acción antitumoral de estos fármacos no es debido sólo y exclusivamente a la producción de radicales libres.

Por otra parte, todos los estudios realizados hasta la fecha sobre la capacidad antiproliferativa del hidroxitirosol han sido llevados a cabo *in vitro* en múltiples líneas celulares, demostrando que este antioxidante disminuye la proliferación de varios tipos de células tumorales promoviendo la apoptosis y la detención del ciclo celular, alterando la expresión transcripcional de los genes que controlan dichos procesos y alcanzando notable importancia como agente quimiopreventivo frente al cáncer, fundamentalmente en el contexto del aceite de oliva virgen.

Con estas premisas, el **objetivo** del presente trabajo es conocer si el hidroxitirosol ejerce alguna acción sobre los efectos secundarios de la adriamicina en el tratamiento del cáncer de mama. Es decir, si reduce o no los efectos tóxicos propios del citostático y/o su capacidad antitumoral. Para tal fin se aplicó un tratamiento con adriamicina, sola o combinada con hidroxitirosol, en ratas con cáncer de mama químicamente inducido con DMBA (7,12-dimetilbenzo(α)antraceno). Además se pretendió constatar por primera vez en un modelo *in vivo* si el hidroxitirosol presenta *per se* características antiproliferativas similares a las descritas *in vitro*, en cuyo caso tratando de diseñar un posible mecanismo de acción atribuible a dicho antioxidante.



**Antecedentes
bibliográficos**

I.- TEORÍA DEL CÁNCER.

El cáncer es una enfermedad compleja, multifactorial, en la que el componente genético tiene un papel fundamental. Aparece como consecuencia de una serie de alteraciones somáticas del ADN acumuladas, y que culminan en una proliferación celular desmedida. Estas transformaciones acumuladas en el material genético o mutaciones, mediadas en su mayoría por cambios en la secuencia de ácidos nucleicos, son el resultado de errores aleatorios de réplica, exposición a agentes carcinógenos o deficiencias de los procesos de reparación del ADN, y van a determinar los procesos de activación de oncogenes o la represión de funciones supresoras de la proliferación celular.

Por otra parte, se pueden generar alteraciones en los mecanismos de transcripción génica de las células, llevando a la destrucción del remodelamiento de la cromatina y por tanto, a una expresión aberrante de los genes, con lo que se puede inducir la proliferación de células indiferenciadas, lo que culmina en el cáncer. Estas alteraciones configuran los cambios epigenéticos; la *epigenética* se define como un conjunto de cambios que alteran el patrón de expresión génica y que persisten a través de por lo menos una división celular, pero que no están causados por cambios en el código del ADN. Los cambios epigenéticos incluyen alteraciones de la estructura de la cromatina, mediadas por la metilación de residuos de citosina en los dinucleótidos de citosina-fosfato de guanina (islas de CpG), la modificación de histonas por acetilación o metilación, y cambios en la estructura cromosómica. Muchos genes importantes, como los supresores tumorales, presentan en sus regiones promotoras con asiduidad dichas islas CpG, con lo cual, si sufren hipermetilaciones, la expresión de estos genes se verá afectada, y por tanto, las transformaciones malignas sucederán con mayor facilidad (Fenton y Longo, 2006).

Un genoma oncogénico presenta numerosas alteraciones a nivel de cromosomas, cromatina y nucleótidos. Las alteraciones pueden ser aberraciones irreversibles en la secuencia o estructura del ADN y en el número de secuencias, genes o cromosomas. O bien, ser cambios potencialmente reversibles (modificaciones epigenéticas del ADN o de las histonas). Estos cambios reversibles e irreversibles afectan a miles de genes, teniendo como consecuencia la activación o inhibición de procesos biológicos, afectando aspectos

relacionados con el cáncer, como la angiogénesis, evasión inmune, metástasis, alteración del crecimiento celular, muerte e incluso el propio metabolismo (Chin y Gray, 2008).

Un aspecto importante a tener en cuenta, es que la génesis de la mayoría de los tipos de cáncer se realiza a partir de una única célula, es decir, el resto de células alteradas son clones de una célula original. Sin embargo, se necesitan innumerables fenómenos de mutación, que se acumulan para que un fenotipo normal evolucione y se transforme en otro totalmente canceroso. Se trataría de un proceso escalonado en el que, en cada fase sucesiva, las células mutadas adquieren alguna ventaja proliferativa que culmina en una representación mayor, en comparación con sus vecinas. Se creen necesarias de 5 a 10 mutaciones acumuladas para que una célula evolucione de su fenotipo normal a otro totalmente maligno (Morin y col., 2006).

En los últimos años se han identificado hasta seis marcas distintivas que son características del fenotipo de las células cancerígenas: autosuficiencia en las señales del crecimiento, desacato de las señales de finalización de la proliferación y de diferenciación, capacidad de proliferación sostenida, evasión de la apoptosis, invasión tisular y angiogénesis. No obstante, estas firmas características no se cumplen en todos los tipos de cánceres (Ponder, 2001; Entschladen y col., 2004). Estas características del fenotipo hacen posible la invasividad, capacidad de generar neoangiogénesis y la metastatización a otros tejidos más o menos cercanos al origen.

Así, podemos definir *neoplasia* como un desorden en el crecimiento celular, caracterizado por una proliferación excesiva, alterada e incontrolada de las células que no guarda relación alguna con las demandas fisiológicas del órgano implicado, dando como resultado una masa anormal, comúnmente llamada tumor, procedente de los tejidos originales. La neoplasia puede ser benigna o maligna, siendo ésta última la que se conoce como cáncer, caracterizado por un rápido crecimiento, invasión y destrucción de los tejidos adyacentes, así como una posterior diseminación por todo el organismo, denominada metástasis y que es la responsable en la mayoría de los casos de la muerte del individuo afectado (Granados y col., 2006).

El término *invasión* indica la penetración y ocupación de los tejidos y estructuras adyacentes. Las células tumorales son capaces de invadir tejidos vecinos escapando de los mecanismos restrictivos del tejido al que pertenece, permitiéndoles penetrar en la circulación (sanguínea o linfática), pudiendo alcanzar órganos distantes y ocasionar tumores secundarios con crecimiento autónomo, proceso conocido como *metástasis* (Mareel y Leroy, 2003). Por último, la *angiogénesis* es necesaria para el aporte de nutrientes fundamentales en el crecimiento del tumor primario, así como para la diseminación de las células tumorales a órganos distantes, formando sitios metastásicos. Para que esto se pueda llevar a cabo, es necesario que el tumor sea capaz de favorecer la formación de nuevos capilares a partir de los vasos preexistentes, es decir, se requiere una activación angiogénica (Fenton y Longo, 2006).

En conclusión, la enfermedad cancerosa es una patología multifactorial desencadenada por una serie de eventos alterantes del material genético irreversibles (genotóxicos) y/o reversibles (epigenéticos), lo que ocasiona un desequilibrio en el balance entre la proliferación y la muerte celular existente en los tejidos, como consecuencia de una expresión exagerada de aquellos genes implicados en la proliferación celular, disminución de los factores pro apoptóticos y anti proliferativos, y aumento de las aberraciones en el material genético como consecuencia del fracaso de los mecanismos reparadores. Estos factores actuando en conjunto promueven la aparición de células con una carga mutacional elevada, capaces de escapar a los mecanismos de regulación fisiológica como la apoptosis, y con una gran habilidad proliferativa, dando lugar a la aparición de multitud de clones que se expanden, constituyendo una neoplasia, que si se acompaña de destrucción e invasión de tejidos adyacentes se considera maligna y recibe el nombre de cáncer.

I.1.- ETAPAS DEL PROCESO CARCINOGENICO.

El cáncer es una patología trifásica en la que hay múltiples factores implicados. No obstante, en la presente memoria de tesis se recoge el trabajo realizado en un modelo de carcinogénesis química en roedores. Por este motivo, resulta indispensable centrar toda nuestra atención en la participación sobre dichos estadios de aquellos agentes químicos

con carácter pro tumoral, así como de los componentes que guardan relación con tales sustancias y su metabolismo, es decir, los radicales libres, y por tanto el estrés oxidativo.

Las etapas de la carcinogénesis son: iniciación, promoción, y progresión

I.1.1.- FASE DE INICIACIÓN.

Es considerada como la primera de las etapas por las que discurre el desarrollo del cáncer. Tiene su inicio en la célula con transformaciones en el ADN, por causas hereditarias, o más comúnmente, por causas genéticas o epigenéticas inducidas por agentes carcinogénicos.

Comienza con la alteración genética irreversible de una célula normal, dando lugar a una mutada, iniciada o preneoplásica; esta mutación, que puede ser esporádica o heredada, es inducida por numerosos agentes genotóxicos que activan o inactivan genes implicados en los procesos de proliferación, diferenciación o apoptosis, evento genotóxico que es dosis dependiente. Por otro lado, posiblemente también estén implicados cambios potencialmente reversibles o epigenéticos. Se necesita la acumulación de mutaciones para que se produzca el cáncer, además, para que la célula cancerosa adquiera un fenotipo maligno, se requieren mutaciones en varios genes diferentes que afecten a vías importantes, como aquellos del ciclo celular, reparación del daño y muerte celular. De este modo, la célula tumoral escapa a los mecanismos reguladores de la proliferación, diferenciación y apoptosis, asegurando que las mutaciones se conservan en los clones posteriores (Forman y *col.*, 2004; Klaunig y Kamendulis, 2004; Escrich y *col.*, 2006; Chin y Gray, 2008).

En esta etapa es donde entran en juego los daños genotóxicos ocasionados por el DMBA, no sólo a nivel de aductos de ADN, sino también por los radicales libres derivados de la activación metabólica de dicho agente (quinonas y epóxidos capaces de generar *per se* radicales como O_2^{\cdot} , H_2O_2 , HO^{\cdot} y 1O_2), mediado por el citocromo P450 y b_5 , que ocasionan oxidación en lípidos y proteínas (Kumaraguruparan y *col.*, 2007), daño

que es sustancial en órganos como la glándula mamaria y el hígado (Anbuselvam y col., 2007).

De forma genérica, los *radicales libres* se definen como aquellas especies químicas, en forma de moléculas o fragmentos de ellas, que contienen electrones desapareados, razón por la cual poseen una elevada reactividad química (Halliwell, 1994; Valko y col., 2007), y por tanto son capaces de interactuar con moléculas de carácter biológico, como el ADN, lípidos (Cejas y col., 2004; Klaunig y Kamendulis, 2004; Hwang y Bowen, 2007), proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Dröge, 2002), o hidratos de carbono (Roy y col., 2004). A la alteración del balance oxidativo (producción de radicales libres y sistema antioxidante del organismo) hacia las sustancias oxidantes se llama *estrés oxidativo* (Halliwell, 1994; Halliwell, 2007a). Las especies reactivas del oxígeno o ERO [radicales libres y otras especies con alta reactividad pero que químicamente no se pueden considerar radicales libres: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidropéroxido (HO_2^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), oxígeno singlete (1O_2)] son las más generadas en los sistemas vivos (Miller y col., 1990), aunque también encontramos aquellas derivadas del nitrógeno [ERN: óxido nítrico ($^{\cdot}NO$), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), nitroperoxicarbonato ($ONOOOCO_2^{\cdot}$), o el dióxido de nitrógeno ($^{\cdot}NO_2$)], del cloro, etc. (Klaunig y Kamendulis, 2004; Valko y col., 2006; Halliwell, 2007a, Valko y col., 2007).

La producción de aductos en el material genético confiere una alta carga de mutaciones a las células normales, transformándolas en preneoplásicas, como consecuencia de un déficit en los sistemas de reparación, como ocurre si no se eliminan los sitios apúricos que genera el DMBA (Todorovic y col., 1997), mientras que, por otra parte, los radicales libres generados provocan una serie de modificaciones mutagénicas que influyen en la iniciación del proceso oncogénico, fundamentalmente relacionados con alteraciones en moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ADN, etc.

Por su parte, los agentes no genotóxicos también pueden inducir la enfermedad cancerosa al incrementar la síntesis de ADN, y con ello también la mitosis, e induciendo una serie de mutaciones en las células en división, por la alteración de los sistemas de reparación (Klaunig y Kamendulis, 2004).

La formación de peróxidos lipídicos por parte de los radicales libres no sólo altera la fluidez de las membranas celulares, al oxidar los ácidos grasos poliinsaturados de los mismos, sino que además, los productos de tal oxidación tienen capacidad alterante. Como ejemplo destacado encontramos el malondialdehído (MDA), un producto final de la oxidación de lípidos que tiene una alta capacidad mutagénica en bacterias y células de mamíferos, y carcinogénica en ratas. Otro derivado aldehídico procedente de esta peroxidación es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que aunque tiene un bajo poder mutagénico, tiene un gran efecto sobre las características fenotípicas de las células al interferir con las rutas de transducción de señales (Valko y col., 2006; Valko y col., 2007).

La actividad biológica de las proteínas se puede ver alterada al sufrir un daño oxidativo, que ocasiona la fragmentación, agregación y un aumento de la susceptibilidad a la degradación, incrementándose la desnaturalización y reduciéndose la actividad (Dröge, 2002).

Estas alteraciones también afectan al material genético, de tal modo que se pueden originar trastornos tanto en el ADN mitocondrial como en el nuclear.

A) *Daño en el ADN mitocondrial.*

El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el nuclear, susceptibilidad que está relacionada con tres factores fundamentalmente: se encuentra cerca de la cadena de transporte de electrones, no está protegido por histonas, y los sistemas de reparación son limitados. Esto parece explicar, al menos en parte, la razón de las mutaciones mitocondriales observadas en las células tumorales (Inoue y col., 2003; Klaunig y Kamendulis, 2004).

B) *Daño en el ADN nuclear.*

Como ya hemos comentado anteriormente, los metabolitos del DMBA se pueden unir al material genético, dando lugar a aductos de ADN. Sin embargo, otra faceta ejercida por este carcinógeno, tiene que ver con la producción de ERO al ser metabolizado, generando aductos oxidativos de ADN. Tanto las ERO como las ERN, son capaces de reaccionar con el ADN, causando roturas simples o de doble hebra,

modificaciones en las bases, en la cadena de desoxirribosa, o incluso entrecruzamientos. Si estas alteraciones afectan a zonas implicadas en el control del ciclo celular, proliferación y apoptosis, y además, los sistemas de reparación no funcionan correctamente, lo más probable es que la consecuencia sea la carcinogénesis (Klaunig y Kamendulis, 2004; Hwang y Bowen, 2007).

El oxígeno singlete y el radical hidroxilo son los principales atacantes del ADN nuclear. De esos dos, el segundo es capaz de reaccionar con las moléculas que constituyen el ADN, dañando tanto las bases púricas como pirimidínicas, así como la cadena de desoxirribosa. Entre los aductos oxidativos, el más conocido es la formación de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG), que presenta una capacidad potencialmente mutagénica, dado que ocasiona transversiones A:T → C:G, alterando la pauta de lectura de la doble hebra (Klaunig y Kamendulis, 2004; Halliwell, 2007b; Hwang y Bowen, 2007; Valko y col., 2007).

Este tipo de lesiones en el material genético se han encontrado en multitud de tumores, implicando a tales daños en la etiología del cáncer, y predominantemente al proceso de iniciación (Valko y col., 2006).

I.1.2.- FASE DE PROMOCIÓN.

Es el proceso reversible por el cual, aquellas células transformadas anteriormente, aumentan su daño genético por la acción continuada del agente lesivo, así como por el incremento en la posibilidad de nuevas mutaciones derivadas de las sucesivas divisiones celulares (Forman y col., 2004; Escrich y col., 2006; Chin y Gray, 2008). Esta fase se caracteriza por la expansión clonal selectiva de las células iniciadas o preneoplásicas, como consecuencia de un aumento en la proliferación y/o disminución de la apoptosis, fase reversible que es dosis dependiente, y que desaparece si se elimina el estímulo promotor (Klaunig y Kamendulis, 2004).

La influencia que presenta el DMBA sobre esta fase ha sido bien documentada con diversos estudios, relacionando la alta capacidad oxidante de este agente con la

promoción tumoral (Arulkumaran y col., 2007); además, estudios *in vitro* han mostrado que el DMBA origina una alta producción, dosis y tiempo dependiente, de H_2O_2 en microsomas de hígado de rata, y ha demostrado ser un oxidante altamente relacionado con esta etapa (Choi, 2008).

Los radicales libres forman parte de los mecanismos de señalización celular asociada al crecimiento y diferenciación celular, y pueden promocionar la proliferación o la apoptosis dependiendo del tipo y concentración del radical implicado (Valko y col., 2006); algunos de los procesos y componentes celulares sobre los cuales estas especies reactivas pueden tener implicaciones son: interacción con receptores de factores de crecimiento y citoquinas, proteínas tirosina fosfatasas y quinasas, factores de transcripción, oncogenes y supresores tumorales, caspasas y uniones intercelulares.

A) *Interacción con receptores de factores de crecimiento y citoquinas.*

La señal mitogénica ejercida por las citoquinas e interferones (ej. $TNF\alpha$, IL-1, $IFN\gamma$) y los factores de crecimiento (ej. EGF, PDGF, VEGF), tiene lugar tras la unión específica con sus receptores, momento en el que se producen ERO, facilitando la autofosforilación del receptor y desencadenando la cascada de señalización intracelular (Dröge, 2002; Valko y col., 2007).

B) *Proteínas tirosina fosfatasas.*

Estas proteínas son las que contrarrestan el efecto de las proteínas tirosina quinasa, devolviendo a la conformación basal a los receptores transmembrana tras la unión con sus ligandos. La inhibición por fosforilación de dichas proteínas tirosina fosfatasa, promovida por altas concentraciones de H_2O_2 , estimula la actividad de las proteínas tirosina quinasa, promoviéndose el crecimiento celular (Valko y col., 2006).

C) *Proteínas quinasas.*

Las proteínas quinasas citoplasmáticas (tirosina o serina/treonina quinasas) forman parte de las cascadas moleculares implicadas en la transducción de señales citoplasmáticas dirigidas al núcleo celular tras la activación de factores de transcripción, previa activación de receptores de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas G heterodiméricas

acopladas a receptores, accionándose la expresión de genes implicados en la proliferación, diferenciación celular y apoptosis.

Las ERO ejercen un importante papel mediador en la activación de las rutas de señalización intracelular en las que intervienen la familia de quinasas MAPK: ERK, JNK y p38 (Dröge, 2002; Laurent y *col.*, 2005), así como la movilización de los depósitos de Ca^{+2} intracelular o el influjo del Ca^{+2} extracelular que contribuye a la activación de quinasas como la proteína quinasa C (PKC) muy importante en la oncogénesis (Valko y *col.*, 2006).

D) Factores de transcripción.

Los factores de transcripción controlan la expresión de genes implicados en la reparación del daño en el ADN, la respuesta inmune, la proliferación celular y la apoptosis. Entre aquellos cuya actividad se encuentra modulada por los radicales libres destacan proteínas esenciales para el control del crecimiento celular como AP-1, $\text{NF}\kappa\text{B}$, o HIF-1.

AP-1 es un factor de transcripción involucrado en numerosas rutas de transducción de señales, implicadas en procesos como: proliferación celular, diferenciación, transformación inducida por oncogenes, invasividad y apoptosis, y que está formado por homodímeros de la familia Jun (c-jun, JunB, JunD) o heterodímeros de la familia Jun con otras familias como Fos (c-fos, FosB, FRA-1, FRA-2) y ATF (ATF-2, -3, -4, y ATFa) (Shen y Brown, 2003; Dorai y *col.*, 2004; Licht y *col.*, 2006; Zhang Y y *col.*, 2007a; Zhang Y y *col.*, 2007b). La inducción de AP-1 mediada por los radicales libres se debe principalmente a la activación de las cascadas de señalización en las que intervienen las quinasas JNK y p38. La ciclina D1 es un gen muy implicado en la proliferación celular, y su expresión es regulada por AP-1, al mismo tiempo que proteínas como $\text{p}21^{\text{waf}}$ que detienen el ciclo celular (Klaunig y Kamendulis, 2004).

$\text{NF}\kappa\text{B}$ es un factor de transcripción que activa la expresión de genes (ciclina D1, proteínas anti apoptóticas como Bcl2 y Bcl-xL, proteínas implicadas en la metástasis y angiogénesis como las MMPs o VEGF). En este caso, las ERO actuarían como segundos

mensajeros mediando la activación de NFκβ vía TNFα e interleuquina-1 (IL-1) (Valko y col., 2007).

En los tumores sólidos como los de mama, se produce una situación de hipoxia como consecuencia de una vascularización insuficiente, condición adecuada para la activación de la proteína HIF-1, que promueve la supervivencia celular, resistencia a la apoptosis y a fármacos, proliferación, etc. (Lim y col., 2004; Kimbro y Simons, 2006). Esta hipoxia es muy típica en los tumores de mama inducidos con DMBA, lo que favorece la expresión de HIF-1 y la producción de radicales libres (Mathivadhani y col., 2007).

E) *Oncogenes y genes supresores de tumores.*

Los radicales libres también son capaces de mediar la expresión y actividad de genes supresores de tumores como el p53, de una manera dosis dependiente, ya que cuando los niveles de ERO son bajos, la expresión de p53 es moderada, y promueve la expresión de genes que codifican proteínas con capacidad antioxidante, sin embargo, cuando los niveles de ERO son mayores, también aumenta la expresión de p53, promoviendo la producción de más radicales libres, finalizando en la apoptosis celular. No obstante, si la concentración de radicales es demasiado elevada, se puede incluso inactivar la expresión de p53, facilitándose de este modo la inmortalización celular (Halliwell, 2007b; Valko y col., 2007).

En cuanto a la activación de oncogenes, las ERO tienen la capacidad de activar al oncogén Ras (Valko y col., 2006).

F) *Caspasas.*

Se ha estudiado el efecto que los radicales libres tienen sobre otros componentes celulares implicados en la apoptosis, como es el caso de las caspasas. Estos radicales libres son capaces de generar productos secundarios responsables de inactivar a estas proteasas, así como al receptor FAS/CD95, y por tanto, bloquear la apoptosis (Shacter y col., 2000).

G) Uniones intercelulares tipo GAP.

La producción de radicales libres modula la formación de estructuras de comunicación intercelular, este bloqueo de las uniones de tipo GAP puede ser un mecanismo de las células tumorales adquirido para evitar el intercambio de moléculas reguladoras de la proliferación con las células vecinas sanas, escapando así de la homeostasis celular y favoreciendo la expansión clonal (Trosko y col., 2005; Valko y col., 2007).

I.1.3.- FASE DE PROGRESIÓN.

Es una fase totalmente irreversible, en la cual, las células experimentan alteraciones genéticas adicionales, resultando en células anormales que expresan un fenotipo maligno y una alta inestabilidad genética. Es en este momento en el que aparece la capacidad invasora y metastásica de la célula (Forman y col., 2004; Escrich y col., 2006; Chin y Gray, 2008). Es decir, se produce el paso de célula preneoplásica a neoplásica, debido a cambios moleculares y celulares, como consecuencia de una gran inestabilidad genética, ploidía nuclear y la destrucción de la integridad cromosómica (Klaunig y Kamendulis, 2004).

En esta fase del proceso tumoral, la influencia de las ERO se centra en aquellos mecanismos que aumenten el potencial migratorio de las células transformadas, ya sea a través de la activación de proteínas de choque térmico (Hsp), como la Hsp27, o por la mediación del papel de Rac-1 en la reorganización del citoesqueleto (Brown y Bicknell, 2001).

II.- CÁNCER DE MAMA.

II.1.- SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA.

El cáncer de mama es la neoplasia más común y la segunda causa de muerte entre la población femenina a nivel mundial, cuya incidencia se ha mantenido en alza desde la cuarta década del siglo pasado en muchos países industrializados, y es mayor en Europa occidental, Estados Unidos y Canadá, mientras que los niveles más bajos de incidencia

los encontramos en Asia (Salehi y col., 2008). Según estimaciones de la IARC (International Agency for Research on Cancer), durante el año 2006 se diagnosticaron unos 429.900 casos de cáncer de mama en Europa, y en la actualidad es el cáncer más comúnmente diagnosticado entre las mujeres americanas (Moulder y Hortobagyi, 2008).

En el caso de España, los datos del año 2002 muestran que la incidencia es inferior en nuestro país en comparación con Europa (GLOBOCAN 2002; WHO, Organización Mundial de la Salud; Pollán y col., 2007), y encontramos diferencias geográficas entre las comunidades autónomas españolas. Valga como ejemplo la menor tasa de incidencia ajustada con la población europea de cáncer de mama que se encuentra en Granada (60.90) con respecto a Gerona (84.69) entre los años 1993 y 1997 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005).

En la actualidad, se han producido una serie de avances en los sistemas de detección precoz de esta enfermedad, como por ejemplo el uso de sistemas de imagen cada vez más sofisticados, no sólo para el diagnóstico, sino también en el ámbito de la investigación oncológica, constituyendo una herramienta de altísima utilidad en el campo de la oncología molecular (Weissleder y Pittet, 2008); esto hace que aumente la fiabilidad y facilidad del diagnóstico patológico, y por tanto, la calidad de los métodos de tratamiento subsiguientes (cirugía, radio y quimioterapia). Esto, junto a una mejora en los tratamientos neoplásicos, y la mayor, y mejor comprensión de la patología, tanto por parte de los clínicos, como de los investigadores, ha contribuido a un aumento de la supervivencia frente al cáncer de mama, y por ende, una disminución en la mortalidad asociada a tal patología (Moulder y Hortobagyi, 2008). En España, la tasa ajustada por edad de supervivencia media (82.8) se encuentra por encima de la media europea (79.0), siendo muy próxima a la de países como Holanda (83.1) o Italia (83.7) (Verdecchia y col., 2007), unido a una disminución en la mortalidad en toda la Europa industrializada, tendencia que se aprecia en países desarrollados como Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos (Parkin y Fernández, 2006; Moulder y Hortobagyi, 2008; Salehi y col., 2008).

II.2.- ETIOLOGÍA DE LA NEOPLASIA MAMARIA.

Se cree que el cáncer de mama se origina como consecuencia de la **pérdida de la heterocigosidad** de uno de los alelos de aquellos genes implicados en la regulación del crecimiento y proliferación celular, como es el caso de los receptores de estrógenos y progesterona, TGF- β , p27, etc. Estos genes, en situaciones fisiológicas, mantienen perfectamente el *status quo* de las células mamarias, pero si en algún momento se pierde la heterocigosidad, se alteran sus pautas y aumenta la proliferación. En los tumores mamarios más comunes, se sugiere que esta pérdida de heterocigosidad comienza en las células epiteliales, donde es un proceso más común que en las células del estroma (Salehi y col., 2008).

Además, esta enfermedad está profundamente afectada por las hormonas. Los **estrógenos** son hormonas esteroideas implicadas en la regulación del crecimiento normal y correcto desarrollo del tejido mamario, que interaccionan con sus receptores (α y β) para iniciar la transcripción de los genes destinados a promover la proliferación celular, y son importantes factores desencadenantes de carcinogénesis mamaria. Los estrógenos inducen la síntesis y posterior secreción de factores de crecimiento, entre los que encontramos VEGF, IGF, bFGF y, el anteriormente mencionado, TGF- β , tanto de células endoteliales como de fibroblastos, mecanismos carcinogénicos ejercidos por los estrógenos al interaccionar muy probablemente con el receptor de estrógenos α . Esto prueba la capacidad que tienen los estrógenos de regular de forma paracrina el crecimiento y supervivencia del tumor ya formado (Gupta y Kuperwasser, 2006; Russo y Russo, 2006; Salehi y col., 2008).

Los mecanismos tumorogénicos que presentan los estrógenos incluyen las rutas de proliferación Src/RAS/ERK y PI3K/AKT, efectos genotóxicos al incrementar los niveles de mutaciones a través de la activación metabólica mediada por el citocromo P450, y la inducción de aneuploidía a través de la mutación génica o pérdida de heterocigosidad (Russo y Russo, 2006; Salehi y col., 2008).

La **progesterona** es otra hormona esteroidea que está implicada en los procesos de maduración de la mama, a través de la inducción de la transcripción de genes tras la interacción con sus receptores (A y B). Al igual que los estrógenos, la progesterona activa la proliferación celular al inducir las rutas de señalización Src/ERK_{1/2} y PI3K/AKT (Salehi y col., 2008).

El conocimiento de los efectos de estas hormonas sobre la génesis del cáncer de mama sin duda es de gran ayuda a la hora de entender el riesgo asociado a la exposición a una serie de agentes químicos denominados *disruptores endocrinos*, que tienen la capacidad de alterar la síntesis, transporte y metabolismo hormonal, como por ejemplo, la ginesteína, dietilestilbestrol, y bisfenol A, que poseen acción estrogénica (Salehi y col., 2008).

II.3.- FACTORES DE RIESGO EN LA NEOPLASIA MAMARIA.

Hay múltiples factores de riesgo implicados en el cáncer de mama. De forma esquemática, los factores que se verán a continuación son:

- 1) Factores genéticos y familiares.
- 2) Factores hormonales y reproductivos:
 - Factores reproductivos.
 - Hormonas endógenas.
 - Terapia hormonal.
 - Anticonceptivos orales.
- 3) Altura.
- 4) Estilo de vida:
 - Obesidad y sedentarismo.
 - Tabaco.
 - Alcohol.
 - Dieta.
- 5) Factores ambientales.
- 6) Factores clínicos.

II.3.1.- FACTORES GENÉTICOS Y FAMILIARES.

Entre estos factores encontramos las **mutaciones genéticas** más conocidas en el cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2, implicados en la regulación transcripcional y reparación del ADN. Pero también polimorfismos en H-ras-1, sulfotransferasa SULT1A1, o el genotipo XRCC3 Met/Met, relacionados con un aumento en la susceptibilidad (Salehi y col., 2008). Además, la mutación constitucional autosómica dominante de TP53 en el síndrome de Li-Fraumeni predispone al cáncer de mama, al igual que la mutación de STK11 en el síndrome Peutz-Jeghers y la de CDH1 (E-caderina) en el cáncer gástrico difuso familiar. La pérdida de heterocigosidad para el supresor tumoral PTEN también proporciona susceptibilidad al cáncer de mama, al igual que la pérdida de ATM. Por su parte, varias mutaciones en CHEK2 aumentan la susceptibilidad a la neoplasia mamaria. La mutación del gen NBS1 implicada en el síndrome de Nijmegen, así como la mutación 687delT del gen RAD50 ocasionan carcinogénesis de la mama familiar. FGFR2, BRIP1 y PALB2 también aumentan el riesgo de cáncer mamario (Campeau y col., 2008).

II.3.2.- FACTORES HORMONALES Y REPRODUCTIVOS.

Los **factores reproductivos** son todos aquellos relacionados con un aumento en el periodo de exposición a los estrógenos: menarquia temprana, menopausia tardía, partos pre término, embarazo a una edad elevada, uso de anticonceptivos orales durante largos periodos, uso de terapia hormonal, y obesidad postmenopáusica (ya que se favorece la conversión de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo) (Ma y col., 2006).

En cuanto a las **hormonas endógenas**, hay una relación entre los altos niveles de estrógenos endógenos, como estrona o estradiol, o sus precursores androgénicos, y el aumento del riesgo de cáncer de mama post y premenopáusico (Eliassen y Hankinson, 2008).

La **terapia hormonal** se usa para aumentar los niveles de estrógenos en la menopausia, momento en el cual, las mujeres tienen un menor contenido en estas

hormonas. Su uso continuado durante al menos 5 años aumenta el riesgo de padecer esta patología mamaria (Salehi y col., 2008).

Por su parte, el uso de **anticonceptivos orales** aumenta el riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, el riesgo vuelve a ser normal 10 años después de la suspensión del tratamiento (Casey y col., 2008; Salehi y col., 2008).

II.3.3.- TALLA DE LAS MUJERES.

Hay una asociación positiva entre la talla y el riesgo de cáncer de mama entre las mujeres post menopáusicas, muy probablemente relacionado con la ingesta energética y el estado nutricional en la infancia y adolescencia, así como el perfil hormonal durante la pubertad (Salehi y col., 2008).

II.3.4.- ESTILO DE VIDA.

La **obesidad** y el **sedentarismo** son dos importantes factores de riesgo sobre el cáncer de mama. El índice de masa corporal, peso en el nacimiento, crecimiento durante la infancia, aumento de peso a partir de los 45 años, y la obesidad post menopáusica, son factores de riesgo relacionados con el cáncer de mama. Del mismo modo que la actividad física genera un menor riesgo de sufrir esta neoplasia (Salehi y col., 2008). El tejido adiposo expresa enzimas del metabolismo esteroideo que promueven la síntesis de estrógenos desde sus precursores androgénicos. Por otra parte, la obesidad está relacionada con un descenso en los niveles de IGFBP-1 y -2, y por tanto un aumento de IGF-1 que tras su unión con la insulina origina un aumento en la proliferación celular e inhibición de la apoptosis, aunque los datos epidemiológicos son inconsistentes. Estudios más recientes evidencian que hormonas derivadas del tejido adiposo como la adiponectina y la leptina pueden estar directamente implicados en el desarrollo del cáncer de mama (Pischon y col., 2008).

El **consumo de tabaco** también ha sido estudiado como posible factor de riesgo de cáncer de mama. El humo del tabaco causa una amplia variedad de tumores en humanos,

y contiene sustancias carcinogénicas mamarias demostradas en animales, no obstante, existe una amplia controversia en cuanto a su papel en la etiología de esta patología (Salehi y col., 2008).

El **consumo de alcohol** se ha relacionado con el aumento en el riesgo de tener cáncer de mama, posiblemente relacionado con un mecanismo hormonal, ya que aumenta los niveles endógenos de estrógenos (Linos y Willett, 2007; Michels y col., 2007).

Diversos componentes de la **dieta** han sido asociados en numerosos estudios con una mayor o menor disposición a sufrir cáncer de mama. Dada la relevancia de este factor, y la gran relación que guarda con la presente memoria de tesis, será tratado de forma individual en Antecedentes Bibliográficos. Apartado III.

II.3.5.- FACTORES AMBIENTALES.

Ciertas **ocupaciones profesionales** están relacionadas con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama. Se trata por ejemplo de personas que están en contacto con radiaciones ionizantes (Doody y col., 2006), solventes orgánicos (Snedeker, 2006), campos electromagnéticos (Hardell y Sage, 2008), etc. No obstante, no todos los estudios apuntan en la misma dirección, así en un estudio de casos y controles realizado por Forssén y colaboradores, no se encontró relación alguna entre la exposición ocupacional a los campos electromagnéticos y el riesgo de neoplasia de la mama (Forssén y col., 2005). En cuanto a los contaminantes ambientales, tienen especial relevancia aquellos con actividad estrogénica (disruptores estrogénicos), bifenilos policlorados como los encontrados en pinturas, insecticidas como *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDT, otros compuestos organoclorados como Mirex, hexaclorobenceno, dieldrín, clordán, TCDD, herbicidas con triazina, aldrín, lindano, etc., además de otros herbicidas y pesticidas. Otros contaminantes relacionados con la carcinogénesis mamaria son el cadmio y los compuestos aromáticos policíclicos como el benzo(a)pireno (ej. dimetilbenzo(α)antraceno o DMBA), benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno (1,2,3-cd)pireno, presentes en diversos productos como los cigarrillos, combustibles fósiles, o alimentos ahumados o a la brasa (Salehi y col., 2008).

II.3.6.- FACTORES CLÍNICOS.

Hay numerosas evidencias que muestran una relación entre la patología proliferativa benigna de la mama con hiperplasia atípica y un aumento en el riesgo de desarrollar un cáncer (Hartmann y *col.*, 2005; Collins y *col.*, 2007; Worsham y *col.*, 2007). Además, una elevada densidad en la mamografía se ha relacionado con un incremento en el riesgo de tener una afección neoplásica mamaria (Martin y Boyd, 2008; Vachon y *col.*, 2007).

III.- PAPEL DE LA DIETA EN EL CÁNCER DE MAMA.

La dieta se considera uno de los principales factores ambientales que contribuyen a la aparición de esta enfermedad, junto con factores metabólicos y genéticos (Willett, 2001; Forman y *col.*, 2004).

Las hipótesis actuales incluidas en los estudios experimentales, así como en los epidemiológicos, proponen la clasificación de alimentos, nutrientes y estilos de vida, en aquellos que incrementan el riesgo de cáncer de mama, y los que lo disminuyen. De este modo, la grasa, productos lácteos, alcohol, hidratos de carbono, o la carne, tienen una relación positiva con esta patología, mientras que otros como la fibra, frutas, verduras, vitaminas, antioxidantes o incluso una restricción calórica, presentan una asociación negativa. De los factores que parecen influir en mayor medida, la grasa procedente de la dieta es el componente cuya implicación en el aumento o disminución del riesgo de tumorigénesis mamaria, ha sido más ampliamente estudiada (Escrich y *col.*, 2006; Escrich y *col.*, 2007).

Como veremos posteriormente, esa distinción entre positivamente o negativamente asociado con el riesgo de cáncer de mama, no tiene tanto que ver con la cantidad de lípidos ingeridos, como con el tipo de los mismos. Razón por la cual, dependiendo del lípido que estudiemos, dicha asociación estará o no a favor del riesgo antes comentado. De este modo, creemos indispensable tratar este factor a parte de la clasificación en función del tipo de asociación con el riesgo de neoplasia de mama.

Los factores dietéticos relacionados con la susceptibilidad a sufrir cáncer de mama se pueden presentar esquemáticamente como:

- 1) Factores con asociación negativa:
 - Antioxidantes.
 - Fibra.
 - Fitoestrógenos.
 - Té verde.
- 2) Factores con asociación positiva:
 - Productos lácteos.
 - Hidratos de carbono.
 - Carne y proteínas.
- 3) Lípidos de la dieta y cáncer de mama.
 - Grasas saturadas.
 - Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)
- 4) Aceite de oliva y cáncer de mama.

III.1.- FACTORES CON ASOCIACIÓN NEGATIVA.

Se refiere a aquellos cuya presencia no está asociada con el aumento del riesgo de cáncer de mama. Los **antioxidantes** podrían ser compuestos capaces de disminuir el riesgo al reducir el daño oxidativo que se produce en el ADN de las células epiteliales. Sin embargo, la mayor parte de los estudios de cohorte realizados sobre la ingesta de vitaminas A, C, E y β -caroteno en relación a la incidencia de cáncer de mama son inconsistentes (Michels y col., 2007).

No obstante, y a pesar de la inconsistencia en los estudios es conveniente recordar que muchos carotenoides son potentes antioxidantes que defienden al ADN del daño producido por las ERO. Además, la vitamina A es capaz de regular la diferenciación celular y puede prevenir la carcinogénesis, observándose un efecto protector de éstos frente al cáncer de mama, reduciendo su riesgo de aparición. Por otro lado, la vitamina E inhibe tumores de mama en roedores, como se ha visto en múltiples experimentos. La vitamina C bloquea la formación de nitrosaminas carcinogénicas y el Selenio inhibe la

proliferación celular en estudios animales, aunque en cantidades de ingesta elevadas (Linos y Willett, 2007; Khan *y col.*, 2008)

La **fibra** también se considera un factor con asociación negativa sobre el cáncer de mama. Se ha especulado mucho sobre el efecto de las dietas ricas en fibra, y la protección que ofrecen frente al cáncer de mama, ya que son capaces de inhibir la reabsorción intestinal de los estrógenos excretados con la bilis. Sin embargo, no se han encontrado estudios que demuestren de forma concluyente este efecto protector, lo cual puede indicar que tal efecto quizás esté más relacionado con el tipo de fibra que con la cantidad total (Linos y Willett, 2007). Wayne y colaboradores describen que las dietas con elevado contenido en fibra son altamente beneficiosas para aquellas mujeres postmenopáusicas que ya han padecido cáncer de mama, puesto que esta fibra presenta influencias sobre hormonas sexuales, insulina, IGF-1 y péptido C (Wayne *y col.*, 2007).

Por otro lado, lo **fitoestrógenos** son compuestos naturales de las plantas clasificados en dos tipos: isoflavonas (presentes en la soja, como la gínesteína) y lignanos (en cereales, semillas, bayas, té, aceitunas, y algunas verduras). Cuando son metabolizados, sus metabolitos pueden mimetizar o modular la acción de los estrógenos endógenos, ya que se unen a sus receptores, e incluso pueden actuar como el tamoxifeno, reduciendo o incluso boqueando los efectos de estrógenos endógenos como el estradiol, aunque son menos potentes. También son capaces de alterar el metabolismo de los estrógenos, evitando la producción de metabolitos genotóxicos, reduciendo de este modo el riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, altas dosis pueden incrementar la actividad de los estrógenos entre las mujeres postmenopáusicas, incluso, se ha visto un aumento de la densidad mamaria y de marcadores de proliferación celular en las mamas de las mujeres consumidoras de soja (Linos y Willett, 2007; Michels *y col.*, 2007), razón por la cual, Salehi y colaboradores advierten que existe un riesgo asociado a la exposición a los llamados agentes disruptores, y entre ellos cita la gínesteína de la soja (Salehi *y col.*, 2008).

Los componentes del **té verde**, como el polifenol epigallocatequina galato, parecen tener efectos antiproliferativos sobre las células tumorales, aunque no hay una asociación

importante entre su consumo y la incidencia del cáncer de mama (Michels y col., 2007; Meeran y Katiyar, 2008).

III.2.- FACTORES CON ASOCIACIÓN POSITIVA.

Se refiere a aquellos cuya presencia está asociada con el aumento del riesgo de cáncer de mama. Entre estos encontramos los **productos lácteos**. Muy probablemente, esté relacionado con el contenido en grasas de este alimento. Además, el consumo de leche induce un aumento en los niveles de IGF-1, al menos a corto plazo, pudiendo afectar al riesgo de cáncer de mama. No obstante, los datos son inconsistentes, al igual que los obtenidos para la leche fortificada en vitamina D (Michels y col., 2007).

En cuanto a los **hidratos de carbono**, los datos epidemiológicos son inconsistentes a la hora de relacionar a los carbohidratos con el riesgo de cáncer de mama, pero sí que parece existir una relación, ya que afecta a la resistencia a la insulina y a los niveles plasmáticos de dicha hormona y de glucosa, aunque también hay que tener en cuenta que, fundamentalmente en mujeres premenopáusicas, parece más importante la calidad que la cantidad absoluta de carbohidratos ingeridos (Key y Spencer, 2007; Michels y col., 2007).

Por su parte, el **consumo de carne** parece estar más relacionada con la grasa que tiene y con los productos genotóxicos derivados de su cocinado (aminas heterocíclicas) (Salehi y col., 2008). Sin embargo, puede ser que el riesgo aumente al incrementarse los niveles de IGF-1 tras el consumo de proteínas incluidas las de la carne, leche y huevos, ya que IGF-1 es un factor mitogénico que estimula el crecimiento celular (Michels y col., 2007).

III.3.- LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA.

Numerosos estudios epidemiológicos en humanos así como experimentos en animales de laboratorio, han implicado de forma directa a la grasa de la dieta como uno de los componentes de la misma relacionado con un aumento del riesgo de padecer

ciertos tipos de cánceres, especialmente de mama, colon y recto, próstata y ovarios. Ciertos estudios sugieren que no es la cantidad sino la calidad de la grasa lo realmente importante en el desarrollo de esta enfermedad. El hecho de que esta relación no exista en todos los cánceres sugiere una acción específica de los lípidos de la dieta mas allá de su aporte calórico (Granados y col., 2006). Los lípidos de la dieta se han asociado de forma particular con los cánceres de mama, colon-recto y próstata, y entre ellos, la tumorigénesis mamaria ha sido, hasta ahora, la más exhaustivamente estudiada (Perez-Jimenez y col., 2005; Escrich y col., 2006).

Desde hace muchos años se conoce la mayor incidencia de cáncer de mama en ratones alimentados con dietas ricas en grasas (Tannenbaum y col., 1942). Numerosos estudios ecológicos realizados en distintos países han establecido una relación positiva entre el consumo *per cápita* de grasa animal y la incidencia de cáncer de mama, sobre todo en mujeres postmenopáusicas (Granados y col., 2006) lo cual no ocurre cuando se consume aceite de oliva. Por el contrario, el grado de incidencia en los países mediterráneos es relativamente bajo comparado con la mayoría de los países occidentales. De este modo, los datos del año 1990 muestran que la tasa de incidencia ajustada por edad por cada 100.000 personas y año de cáncer de mama en los países mediterráneos es de 43, mientras que en otros países como Escandinavia, Reino Unido y Estados Unidos la misma tasa de incidencia es de 64, 70 y 90 respectivamente, con respecto a la población mundial (Trichopoulou y col., 2000).

Han sido muchos los estudios de tipo caso-control que se han llevado a cabo con el fin de relacionar el consumo de grasa con el incremento del riesgo de padecer neoplasias mamarias. Sin embargo los resultados obtenidos son contradictorios (Kushi y Giovannucci, 2002; Duncan, 2004; Binukumar y Mathew, 2005).

Si hacemos una revisión de los estudios ecológicos, podemos comprobar cómo hay unos que establecen una relación positiva entre el consumo de grasa total y el riesgo de padecer cáncer de mama (Bingham, 2003), otros describen una relación positiva no significativa (Cho, 2003) y otros no encuentran relación alguna (Byrne y col., 2002).

Estos resultados contradictorios en los estudios epidemiológicos se explican atendiendo a que en la relación entre el consumo de grasa y el riesgo de sufrir cáncer de mama es más importante el tipo de grasa que la cantidad total ingerida (Duncan, 2004). Por esta razón, nos centraremos en el efecto de las grasas saturadas, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 y n-6 sobre el riesgo de padecer esta patología.

El elevado consumo de **grasas saturadas** se relaciona de forma positiva con un incremento en el riesgo de cáncer de mama, hecho que ha quedado patente mediante numerosos estudios y que son recogidos por otros autores como Do y colaboradores (Do y col., 2003). En el cáncer de mama experimental, las grasas saturadas ejercen un papel promotor de la carcinogénesis, aunque eso sí, menos potente que el ejercido por los AGPI n-6, efecto similar al que producen los ácidos grasos trans (Escrich y col., 2006).

En cuanto a los **ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)**, varios estudios han analizado la posible relación del cociente de AGPI n-3/n-6 y el posible papel que pueden jugar en el riesgo del cáncer de mama, la mayoría de ellos han observado que un cociente de AGPI n-3/n-6 más alto puede reducir el riesgo de neoplasia mamaria. Además, el consumo de pescado rico en AGPI n-3 está negativamente asociado con la incidencia de carcinogénesis de la mama. La relación existente entre los AGPI n-3 y n-6 con esta patología ha sido muy estudiada, y en muchas revisiones, queda patente la moderada asociación inversa entre la carcinogénesis mamaria y el consumo de AGPI n-3, al igual que la moderada asociación positiva entre los AGPI n-6 y el riesgo de este tipo de cáncer (Binukumar y Mathew, 2005; Escrich y col., 2007; Simopoulos, 2008).

Los estudios experimentales llevados a cabo muestran que los AGPI de la serie n-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n-6), son los principales promotores de carcinogénesis (Escrich y col., 2007). Dicha promoción está asociada al hecho de que provocan el aumento en la expresión de COX-2. En relación a este aspecto se diferencian de los AGPI de la serie n-3, que sí disminuyen la expresión de dicha enzima (Escrich y col., 2007). En relación a este hecho, Escrich y colaboradores comprobaron como una dieta con alto contenido en AGPI n-6 mostraba una alta capacidad estimulante de carcinogénesis mamaria experimental (Escrich y col., 2001), aspecto corroborado por otros

estudios (Solanas y col., 2002; Moral y col., 2003). Dentro de esta familia de AGPI, el ácido γ -linolénico (18:3n-6) es una excepción dado que se le han encontrado propiedades antiproliferativas (Kapoor y Huang, 2006). Además, el ácido linoleico conjugado podría tener un efecto inhibidor en el cáncer de mama (Kelley y col., 2007).

En referencia a los AGPI de la serie n-3 (ácido α -linolénico, DHA o ácido docosahexanoico y EPA o ácido eicosapentanoico), los estudios llevados a cabo muestran un efecto inhibidor del crecimiento tumoral mamario y metástasis, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Los mecanismos biológicos de los AGPI n-3 en la carcinogénesis mamaria incluyen una inhibición de la producción de eicosanoides, disminución de la producción de COX-2, alteración de la respuesta de la proteína quinasa C al estímulo por hormonas y factores de crecimiento, cambio en la expresión de genes a través de rutas mediadas por PPAR, disminución de la expresión del factor nuclear NF κ B e inducción de la apoptosis celular (Escrich y col., 2006; Escrich y col., 2007).

III.4.- ACEITE DE OLIVA Y CÁNCER DE MAMA.

El aceite de oliva es un producto complejo formado por un número muy elevado de compuestos, desde ácidos grasos, pasando por una amplia fracción fenólica, hasta los pigmentos que le dan su color tan característico (Ramirez-Tortosa y col., 2006). Por supuesto, entre tanta cantidad y variedad de sustancias, hay algunas que presentan características especiales, lo que las hace poseedoras de actividades saludables, como por ejemplo, frente a enfermedades cardiovasculares, envejecimiento, Alzheimer, cáncer (mama, próstata, colon,...), etc., como quedó establecido en el primer documento consenso sobre el aceite de oliva virgen y sus efectos beneficiosos para la salud en Jaén (Perez-Jimenez y col., 2005).

Una visión general de la capacidad antitumoral/quimiopreventiva del aceite de oliva virgen, nos indica que éste presenta un efecto protector en las distintas etapas del proceso carcinogénico, se podría decir que presenta una protección trifásica. Así, en la fase de iniciación, previene el daño oxidativo generado en el ADN, o bien la rotura de sus hebras. Por otra parte, los mecanismos por los cuales el aceite de oliva virgen ejerce sus

efectos protectores en la promoción y progresión del cáncer, se podrían deber a por cambios en las membranas celulares, alterando la biosíntesis tumoral de eicosanoides y las rutas de señalización, a la modulación de la expresión génica y a la prevención del daño en el ADN inducido por las ERO (Perez-Jimenez y col., 2005).

Como es lógico, es imposible hacer un estudio de todos y cada uno de los componentes del aceite de oliva virgen, y su relación con el cáncer de mama. Por esta razón, a continuación se van a revisar los más representativos: ácido oleico, escualeno y esteroides, y compuestos fenólicos.

III.4.1.- ÁCIDO OLEICO.

Estudios de tipo casos-control realizados en España, Italia, y Grecia (Quiles y col., 2001), afirmaron que el consumo de aceite de oliva está relacionado con una reducción significativa de entre el 14 y el 34% en el riesgo de cáncer de mama. El papel de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) procedentes de aceite de oliva (ácido oleico) ha dado lugar a una gran controversia en numerosos estudios. De este modo han sido relacionados directa o inversamente con el riesgo de cáncer de mama (Binukumar y Mathew, 2005; Granados y col., 2006).

Los AGMI, fundamentalmente el ácido oleico (*Figura 1*), han dado resultados muy diferentes, desde un efecto no promotor, pasando por un efecto débilmente promotor hasta un cierto efecto protector (Escrich y col., 2006). Estudios como el de Costa y colaboradores han descrito cierta actividad mitótica por parte del ácido oleico, que podría ser debido al aumento de la ingesta calórica asociada al consumo de aceite de oliva (Costa y col., 2004). Ha quedado demostrado el papel modulador, posiblemente protector, del aceite de oliva virgen extra en la aparición y progresión de cáncer de mama experimental, mostrando un mayor tiempo de latencia, menor incidencia y menor multiplicidad tumoral. Sin embargo, sólo se ha observado una progresión más lenta y no una regresión tumoral (Escrich y col., 2006). Menéndez y colaboradores, describieron el efecto promotor de la apoptosis por parte del ácido oleico en líneas celulares humanas de cáncer de mama como consecuencia de la inhibición de la expresión del oncogén HER-2/*neu* (Menendez y

col., 2005). Anteriormente ya habían observado la capacidad del ácido oleico de potenciar la citotoxicidad del paclitaxel en células MDA-MB-231 (Menendez y col., 2001). Estos resultados sugieren que las dietas con alto contenido en aceite de oliva no presentan por ellas mismas capacidad terapéutica (Solanas y col., 2002).

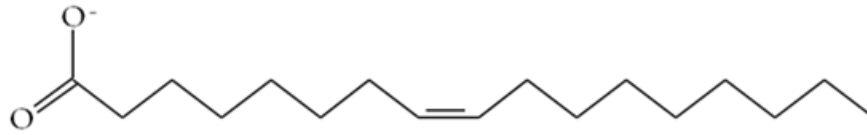


Figura 1. Estructura molecular del ácido oleico.

Los AGMI, en comparación con los AGPI, presentan un doble enlace, haciéndolos menos susceptibles a la oxidación, contribuyendo a la acción antioxidante y altamente estabilizadora dentro de la propia aceituna (Waterman y Lockwood, 2007). Concretamente, el alto contenido en ácido oleico del aceite de oliva, se ha relacionado con un efecto protector frente al daño oxidativo sobre el ADN, previniendo de este modo la iniciación tumoral (Escrich y col., 2007). No obstante, hay un estudio realizado por Yu y colaboradores, en el que se indica que el ácido oleico podría ser un potencial carcinógeno tras la epoxidación del 17β -estradiol (Yu y col., 2004).

Como hemos visto en otras secciones de la presente memoria de tesis, el cáncer de mama tiene un gran componente hormonal, y concretamente, el ácido oleico se ha visto capacitado para inhibir la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, que se encuentra en las primeras fases del metabolismo de los AGPI, así como para probablemente reducir de la producción de PGE_2 (prostaglandina E_2). Además de su capacidad proangiogénica es protumorigénico y aumenta la síntesis de estrógenos al aumentar la expresión de la aromatasas (CYP19) (Escrich y col., 2007; Howe, 2007), lo que produce también una alteración de las rutas de transducción celular. También presenta propiedades moduladoras de la membrana y funciones celulares, como la modificación de las propiedades de la fosfatidilentanolamina, que posteriormente se incorpora a los fosfolípidos de las membranas y reduce la peroxidación lipídica, así como la regulación de la función y localización de proteínas G. Por último destacar que, junto a una propiedad supresora de la función inmune, el ácido oleico también es capaz de regular la expresión génica

(Escrich y col., 2007; Waterman y Lockwood, 2007). En este sentido, tiene la capacidad de reducir la expresión de HER-2/*neu*, tanto sólo como en combinación con trastuzumab (Herceptin®), en células de cáncer de mama, a través de un mecanismo que implica la sobre regulación de PEA-3 (Polyomavirus Enhancer Activator-3), que es capaz de reprimir la expresión de HER-2/*neu* (Menendez y col., 2005; Menendez y col., 2006).

III.4.2.- ESCUALENO Y ESTEROLES.

El **escualeno** es un hidrocarburo triterpénico (*Figura 2*) intermediario en la biosíntesis del colesterol, el cual de forma tradicional se ha sugerido como el responsable del menor riesgo de cáncer de mama atribuido al consumo de aceite de oliva (Newmark, 1999; Sotiroudis y col., 2003; Sotiroudis y Kyrtopoulos, 2008). Debido a su estructura, parece probable que presente cierta capacidad antioxidante, más relacionada con la eliminación de oxígeno singlete que de radicales hidroxilo. No obstante, los estudios *in vitro* y en animales sugieren que el papel antitumoral del escualeno está relacionado con el efecto inhibitor de la actividad catalítica de la HMG-CoA (hidroxi-metilglutaril-CoA reductasa), lo que afecta a la activación de oncogenes como Ras (Waterman y Lockwood, 2007; Sotiroudis y Kyrtopoulos, 2008).

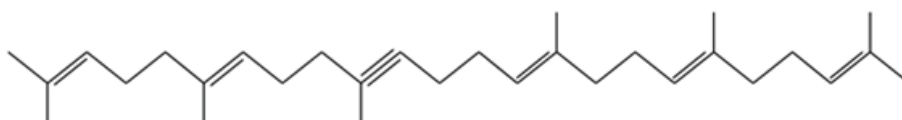


Figura 2. Estructura molecular del escualeno.

En cuanto a los **esteroles** presentes en el aceite de oliva, se trata de compuestos como el β -sitosterol o el campesterol, que presentan actividad anticarcinogénica *in vitro*, aunque dicho papel protector ocurre a elevadas concentraciones (Waterman y Lockwood, 2007; Sotiroudis y Kyrtopoulos, 2008).

III.4.3.- COMPUESTOS FENÓLICOS.

En este apartado vamos a ver los mecanismos antitumorales/quimiopreventivos fundamentales de: lignanos, secoiridoides (oleuropeína) y alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol).

Como se ha revisado anteriormente, los **lignanos**, junto a las isoflavonas, completan un grupo de compuestos fitoquímicos que al ser metabolizados, dan lugar a compuestos de estructura similar a los estrógenos, y que reciben el nombre de fitoestrógenos. Los lignanos tienen actividad antiestrogénica, antiangiogénica, proapoptótica y antioxidante (Sotiroidis y Kyrtopoulos, 2008), y en células MCF-7 de carcinoma de mama han demostrado ser capaces de disminuir la proliferación inducida por el estradiol, así como la disminución de los niveles de estradiol libre (Owen y col., 2004).

Entre los **secoiridoides** y **alcoholes fenólicos** encontramos al tirosol, hidroxitirosol y la oleuropeína (*Figura 3*). El principal mecanismo asociado a la capacidad anticancerígena atribuido al hidroxitirosol y oleuropeína, es el relacionado con su alta capacidad antioxidante (Owen y col., 2000; Visioli y col., 2002). Es de sobra conocido, que aquellos compuestos que presentan en su estructura el grupo catecol tienen una elevada potencia antioxidante. Concretamente, tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína presentan ese grupo catecol en su estructura molecular, razón por la cual, tienen la facultad de eliminar de forma muy eficiente los radicales libre, incluso mejor que la vitamina E o el dimetilsulfóxido (DMSO), lo que implica una prevención del daño oxidativo en el ADN, previniendo así la mutagénesis y carcinogénesis (Owen y col., 2000; Visioli y col., 2002). Por su parte, el tirosol presenta mucha menos actividad antioxidante, razón por la cual, se necesitan cantidades elevadas de este compuesto para que dicha actividad sea adecuada (Waterman y Lockwood, 2007). Recientemente, otro compuesto secoiridoide, el oleocantal, ha sido estudiado como un inhibidor de la ciclooxigenasa y presentando una capacidad antiinflamatoria (Beauchamp y col., 2005).

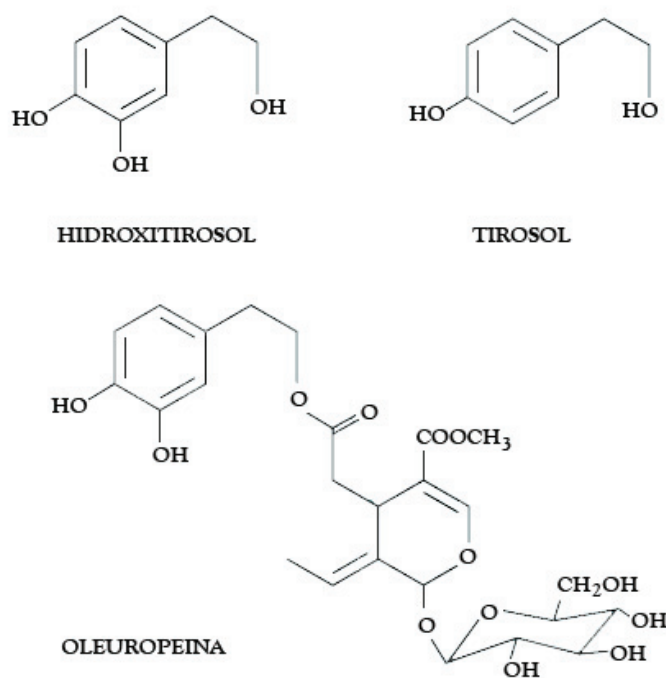


Figura 3. Estructuras moleculares de los alcoholes fenólicos hidroxitirosol y tirosol, y del secoiridoide oleuropeína.

Como se verá más adelante, el hidroxitirosol procede de la ruptura de la oleuropeína (Ramírez-Tortosa y col., 2006), razón por la cual comparten algunas acciones. Así por ejemplo, el hidroxitirosol es capaz de inhibir la expresión de HER2 en células de cáncer de mama resistentes a trastuzumab que sobreexpresan este oncogén (SKBR3), además de presentar actividad citotóxica sobre dichas células SKBR3, MCF7 (células de cáncer de mama con expresión natural de HER2) y MCF7/HER2 (células de cáncer de mama que sobreexpresan el oncogén) (Menendez y col., 2007). Sin embargo, los mejores resultados se han observado para la oleuropeína aglicona, que además de tener amplificados estos efectos, también produce apoptosis en dichas células (Menendez y col., 2007). Además, tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína se han mostrado como potentes inhibidores de la enzima ácido graso sintasa, enzima clave de la conversión de hidratos de carbono en grasas y que tiene una gran implicación en la carcinogénesis, en células SKBR3 y MCF7 que sobreexpresan el receptor HER2, lo que le confiere un alto poder quimiopreventivo (Menendez y col., 2008).

Dada la importancia del hidroxitirosol en el trabajo que aquí se presenta, éste será tratado de forma individual a continuación. No obstante, de forma somera se pueden adelantar algunos de los mecanismos propuestos a la hora de explicar su potencial efecto antitumoral. Y es que, junto a su alta capacidad antioxidante, reduce la actividad de las enzimas ciclooxigenasas, NAD(P)H oxidasa y lipooxigenasas, además de disminuir la agregación plaquetaria (Escrich y col., 2007; Waterman y Lockwood, 2007).

IV.- HIDROXITIRO SOL (HT).

El hidroxitirosol es un compuesto fenólico hidrofílico (concretamente un alcohol fenólico) de la fracción minoritaria del aceite de oliva. Procede de la hidrólisis de la oleuropeína que se origina durante el proceso de maduración de las olivas, almacenamiento del aceite y elaboración de las aceitunas de mesa. A lo largo de estos procesos se da lugar a oleuropeína aglicona, HT y ácido elenólico, responsables en parte de ese gusto tan complejo y variado del aceite de oliva (Visioli y col., 2006) (*Figura 4*).

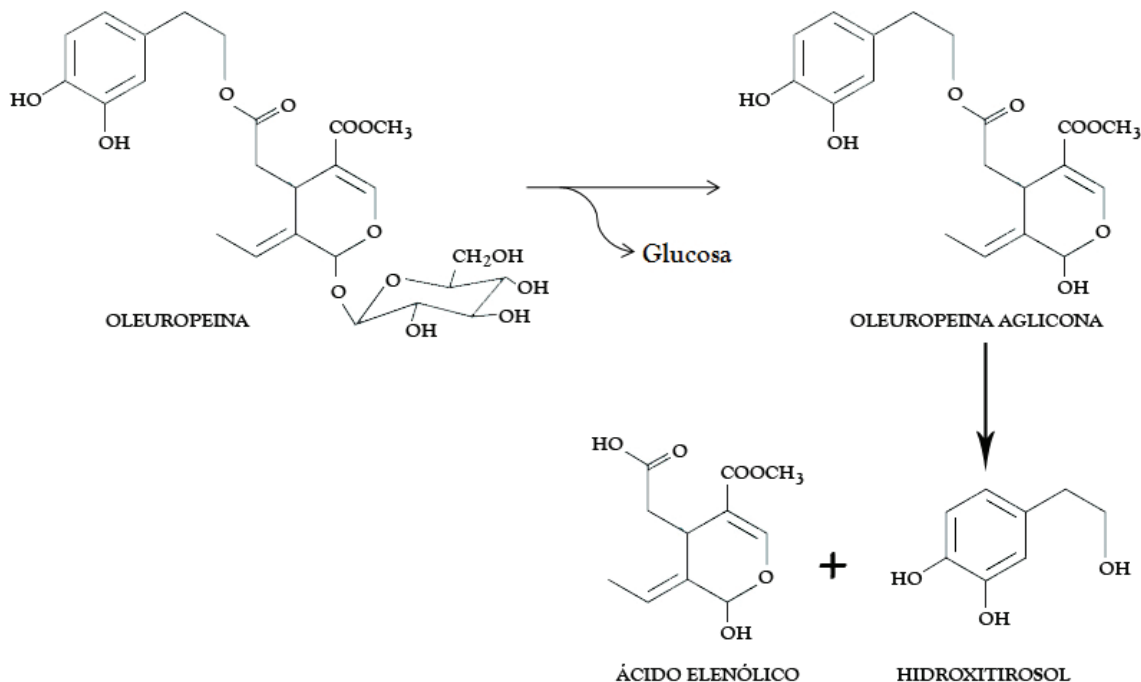


Figura 4. Procedencia del hidroxitirosol a partir de oleuropeína.

Como consecuencia del carácter polar de los compuestos fenólicos, entre los que se incluye el HT, se van a encontrar en grandes cantidades en los residuos procedentes del proceso de elaboración del aceite como el orujo, alpechín o las aguas de lavado. Por tal motivo, estos subproductos de la producción del aceite de oliva constituyen una fuente muy importante de HT. No obstante, el HT también tiene un comportamiento anfipático, razón por la cual esta molécula se encuentra en el aceite de oliva, donde su contenido oscila entre 113.7 y 381.2 mg/kg (Brenes y *col.*, 2000; Fernández-Bolaños y *col.*, 2002). Además de encontrarse en la oliva, el HT también se localiza en la hoja del olivo, aunque se ve acompañado de otros compuestos fenólicos como la oleuropeína (Briante y *col.*, 2002).

España, junto a otros países mediterráneos como Italia o Grecia, tiene una gran tradición en el cultivo de la aceituna y en la elaboración y consumo del aceite de oliva, presentes ambos en nuestra dieta de forma habitual. La ingesta media de hidroxitirosol aportado por la dieta en España y publicado para el año 2002 es de aproximadamente 8 mg/día (Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta nacional de salud de España, 1989-1999).

IV.1.- FARMACOCINÉTICA DEL HIDROXITIRO SOL.

De forma general, se puede decir que los compuestos fenólicos del aceite de oliva tienen una absorción dosis-dependiente en animales y humanos, siendo excretados por orina, principalmente como glucurono-conjugados (Visioli y *col.*, 2006).

La absorción del hidroxitirosol se produce en el intestino delgado y colon (Vissers y *col.*, 2002) y se ha sugerido que el transporte a través del epitelio intestinal se puede producir mediante difusión pasiva bidireccional (Manna y *col.*, 2000). La absorción de este compuesto se produce de forma rápida, alcanzando una concentración plasmática máxima a los 5-10 minutos tras su ingesta, seguido de una rápida disminución (Bai y *col.*, 1998). La absorción del HT en ratas es diferente en función del vehículo que se utilice. Así por ejemplo, Tuck y colaboradores demostraron que se absorbe un 75% de HT cuando se administra en solución acuosa, y un 90% cuando se administra en vehículo

oleoso (Tuck y col., 2001). En un estudio similar pero en humanos, Visioli y colaboradores (Visioli y col., 2003), observaron que la eliminación de HT por orina es mayor cuando se administra en forma de aceite de oliva que cuando se hace con yogurt bajo en grasa o cuando dicho aceite está enriquecido en compuestos fenólicos. No obstante, hay que mencionar que debido a diferencias existentes entre ratas y humanos, tanto la absorción como la posterior excreción del HT y sus metabolitos difieren entre ambas especies (Visioli y col., 2003).

Por último, tras la absorción postprandial se produce la unión del HT (así como de otros fenoles del aceite de oliva) a las lipoproteínas humanas circulantes (Bonanome y col., 2000). Tanto en plasma, como excretados en orina encontramos: HT sólo, sus derivados *orto*-metílicos (alcohol homovanílico), glucurono-derivados (Miro-Casas y col., 2003), y sus glutathionil-conjugados (Corona y col., 2006).

Un estudio de distribución tisular tras administración intravenosa de HT marcado con radiactividad en ratas (D'Angelo y col., 2001), ha demostrado que su vida media en sangre es de 1-2 minutos, y que a los 5 minutos tras la inyección la mayor parte del HT marcado se encuentra en el riñón, lugar donde se acumuló hasta diez veces más HT radiactivo que otros órganos como músculo esquelético, hígado, pulmones, y corazón, los cuales presentaron niveles muy similares entre sí. Se ha demostrado que el HT es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, apareciendo en el cerebro, aunque hay que tener en cuenta que el HT puede ser generado endógenamente a partir de la dopamina (Edwards y Rizk, 1981) y del ácido dihidroxifenilacético a través de la dihidroxifenilacético reductasa del cerebro (Xu y Sim, 1995). A las 5 horas tras la inyección sólo permanece en el organismo de los animales un 0.1% del HT marcado.

El HT se metaboliza rápidamente, primero en los enterocitos y después en el hígado, encontrándose sus metabolitos en sangre 5 minutos después de la inyección intravenosa (D'Angelo y col., 2001). Como ya se ha indicado anteriormente, en plasma se encuentran HT sólo, derivados *orto*-metílicos (alcohol homovanílico), glucurono-derivados, y sus glutathionil-conjugados, estableciéndose que quizás, los derivados del ácido glucurónico y glutathionil-conjugados se obtienen en los enterocitos e hígado, mientras que el alcohol

homovanílico aparece tras el metabolismo del HT en el hígado (Corona y col., 2006). D'Angelo y colaboradores proponen tres vías de metabolismo para el HT:

- 1) *Oxidación*: a través de las enzimas alcohol-deshidrogenasa y aldehído-deshidrogenasa, dando lugar al ácido dihidroxifenilacético (DHPA).
- 2) *Metilación*: a través de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), dando lugar al alcohol homovanílico (AH).
- 3) *Metilación-Oxidación*: reacción que se produce para formar el ácido homovanílico (AcH).

También se generan un elevado número de conjugados con glucurónido y sulfato a partir del HT y de los metabolitos antes mencionados, siendo detectables tanto en plasma como en orina (Tuck y col., 2002).

El tiempo que tardan el HT y sus metabolitos en ser eliminados por la orina oscila entre 5 horas para ratas (D'Angelo y col., 2001) y 4 horas para humanos (Miro-Casas y col., 2001). Con anterioridad, ya se han mencionado las diferencias existentes entre humanos y ratas tanto en absorción como en eliminación de HT y sus metabolitos, principalmente debido a la ausencia de vesícula biliar en estos roedores. Este hecho supone que en ratas la absorción y eliminación sea menor que en humanos, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de extrapolar los resultados de absorción/excreción procedentes de experimentos con ratas (Visioli y col., 2003; Visioli y col., 2006).

IV.2.- ESTUDIOS DE TOXICIDAD CON HIDROXITIRO SOL.

Con el fin de testar la posible toxicidad de altas dosis de HT, D'Angelo y colaboradores administraron una dosis única de 2 g/kg de peso corporal en ratas, encontrando una ausencia de efectos tóxicos o alteraciones macroscópicas en órganos; sólo se indicó la aparición de piloerección a las 2 horas de la administración que desapareció antes de 48 horas (D'Angelo y col., 2001). Más recientemente, se ha publicado

un trabajo en el que la ausencia de toxicidad aguda y crónica es la nota predominante, usando una dosis de 2000 mg/kg/día de HT, sin encontrar efectos teratogénicos ni mutagénicos (Christian y *col.*, 2004).

IV.3.- HIDOXITIRO SOL Y SALUD.

Desde hace años el aceite de oliva se ha considerado como un producto con abundantes propiedades saludables. Los primeros estudios llevados a cabo mostraban su capacidad bactericida (Stevens, 1936), antirraquítica (Kon y Booth, 1934), así como su posible contenido en vitamina E (Ruccia, 1953). A partir de este momento, las investigaciones posteriores comenzaron a centrarse en las modificaciones del perfil lipídico que el aceite de oliva origina en animales de experimentación (Wagner, 1957). Comenzaban a describirse los efectos beneficiosos de este aceite y compuestos como el ácido oleico y escualeno en la secreción gástrica y movilización del colesterol (Schneider, 1958; Okey y *col.*, 1959).

En 1962, Gounelle y colaboradores comenzaron a dudar sobre qué compuesto procedente del aceite de oliva era el que disminuía los niveles de colesterol. Ya que no podía ser sólo consecuencia de los lípidos ingeridos a través de este aceite. La razón era que países no mediterráneos consumían iguales o mayores cantidades de ciertos ácidos grasos que aquellos con dieta mediterránea (Gounelle y *col.*, 1962). A partir de este momento el ácido oleico comenzó a estudiarse por sus posibles efectos beneficiosos sobre procesos como la aterosclerosis (Novikova, 1968), la trombosis (Hornstra y Lussenburg, 1975), y otros.

La investigación realizada durante décadas sobre los efectos saludables del aceite de oliva se ha centrado fundamentalmente en la enfermedad cardiovascular. Así, el estudio de los Siete Países concluyó que el consumo de AGMI, y concretamente de este aceite, es un factor clave en la cardioprotección encontrada en los países mediterráneos (Keys, 1970; Keys, 1980; Keys y *col.*, 1986). En general, los estudios epidemiológicos realizados no son consistentes. Sin embargo, en combinación con estudios de tipo caso-control, así como con estudios metabólicos y bioquímicos, apuntaron hacia los efectos saludables del

consumo de aceite de oliva, fundamentalmente en asociación con la dieta mediterránea (Massaro y *col.*, 2006). Esta capacidad del aceite de oliva se ha relacionado con su contenido en AGMI, hasta tal punto que la American Health Association (AHA) indicó que el consumo de una dieta moderadamente rica en AGMI (15% de la ingesta calórica), y relativamente baja en AGPI (8% de la ingesta calórica) proporciona efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular (Kris-Etherton, 1999).

Hoy día no hay duda acerca de que el tipo de grasa ingerida a través de la dieta influye de forma significativa sobre diversos aspectos de la salud. De este modo, es conocido que los ácidos grasos saturados incrementan los niveles plasmáticos de LDL, mientras que el ácido oleico aumenta los de HDL a la vez que disminuye ligeramente los de LDL (Katan y *col.*, 1994; Katan y *col.*, 1995). Estas influencias también tienen lugar sobre parámetros bioquímicos a nivel de membranas biológicas como la mitocondrial (Mataix y *col.*, 1998; Quiles y *col.*, 1999a) o de eritrocitos (Ruiz-Gutierrez y *col.*, 1996). En este sentido, se sabe que el perfil lipídico de la dieta es capaz de modificar la composición en ácidos grasos de las membranas biológicas, así como diversos aspectos estructurales y funcionales del sistema de transporte electrónico mitocondrial y la susceptibilidad de la membrana mitocondrial a la oxidación (Quiles y *col.*, 1999b; Ochoa-Herrera y *col.*, 2001). En el caso concreto del aceite de oliva, se ha demostrado que genera membranas más resistentes a la peroxidación lipídica y más funcionales en comparación con lo que ocurre con fuentes grasas poliinsaturadas como el aceite de girasol (Quiles y *col.*, 2006).

Los estudios concernientes a la capacidad antioxidante del aceite de oliva se extienden a varios campos. Por ejemplo, se ha descrito un incremento en la capacidad antioxidante de la sangre de voluntarios alimentados con aceite de oliva (Perona y Ruiz-Gutierrez, 2006). En referencia a la oxidación de las LDL, se ha observado que los AGPI n-3 incrementan la susceptibilidad de las LDL a tal oxidación, en comparación con los AGPI n-6 y AGMI (Ramirez-Tortosa y *col.*, 1998). Sin embargo, las alteraciones oxidativas de la LDL producidas por un alto porcentaje de AGPI n-3 se pueden reducir con la administración simultánea de aceite de oliva (Ramirez-Tortosa y *col.*, 1999a). Estos efectos de los AGMI sobre los lípidos circulantes y lipoproteínas aún generan controversia, a

pesar de que el consumo predominante de ácido oleico se ha relacionado con efectos saludables (Visioli y *col.*, 2006).

El aceite de oliva presenta otras acciones beneficiosas sobre la salud, como por ejemplo la reducción de la hipertensión (Perona y Ruiz-Gutierrez, 2006), la mejora de las situaciones trombogénicas (Miranda y *col.*, 2006; Ruano y *col.*, 2007), la prevención y mejora de la diabetes (Wright, 2006), reducción de los procesos inflamatorios (Yaqoob, 2006; Puertollano y *col.*, 2007), mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal (Llor y *col.*, 2006), etc., efectos relacionados con el contenido en AGMI (ácido oleico) del aceite de oliva. Además, la ingesta de dietas con aceite de oliva supone un descenso en la actividad secretora pancreática exocrina en perros, lo que implica un incremento en la utilización de determinados nutrientes como las proteínas (Ballesta y *col.*, 1990; Ballesta y *col.*, 1991). Este efecto está relacionado con los efectos del ácido oleico sobre el balance estimulación-inhibición de la secreción pancreática (Yago y *col.*, 1997), y otros beneficios a nivel gastrointestinal (Mañas y *col.*, 2006).

Como hemos podido observar, los efectos saludables del consumo de aceite de oliva se han relacionado tradicionalmente con su alto contenido en ácido oleico. Esto ha sido también así en el caso de la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, en relación a esto último hay que tener en cuenta que otros alimentos como la carne de cerdo y pollo también son ricos en este ácido graso. La ingesta de estos alimentos es sólo algo superior en los países mediterráneos en comparación con EEUU, por lo que los niveles de ácido oleico son bastante parecidos. Además, se ha visto como la población femenina de Malmö (Suecia) presenta mayores niveles de ácido oleico con respecto a las mujeres de Granada (España). A pesar de estos niveles similares e incluso superiores, la población mediterránea presenta menos casos de enfermedades cardiovasculares. Esta argumentación induce a pensar que el ácido oleico no es el único responsable de la protección cardiovascular del aceite de oliva (Covas y *col.*, 2006b; Visioli y *col.*, 2006; Martínez-González y *col.*, 2008).

En el sentido de que algún otro componente del aceite de oliva, aparte del ácido oleico esté relacionado con sus propiedades beneficiosas, diversos estudios realizados en la

última década han sido llevados a cabo. Así, Ochoa y colaboradores han descrito la relativa importancia de las fracciones saponificable e insaponificable del aceite de oliva virgen sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de corazón de conejo (Ochoa y *col.*, 1999). En ese mismo año, Ramírez-Tortosa y colaboradores encontraron que el ácido oleico no era el único compuesto responsable del efecto antioxidante del aceite de oliva. De este modo, otros compuestos, principalmente los fenólicos de la fracción insaponificable, debían de ser los responsables, al menos en parte, de los efectos saludables del aceite de oliva (Ramírez-Tortosa y *col.*, 1999b). Otros estudios han redundado en los aspectos beneficiosos de los compuestos minoritarios del aceite de oliva virgen. Así, se ha visto que el aceite de oliva refinado (exento de dichos fenoles), no tenía los efectos antioxidantes que sí presentaba el de oliva virgen (Quiles y *col.*, 1999b; Quiles y *col.*, 2002a). Posteriormente, estos autores describieron que la fracción fenólica del aceite de oliva mejoraba considerablemente la peroxidación lipídica de las lipoproteínas LDL, relacionado con un aumento de la capacidad antioxidante (Ochoa-Herrera y *col.*, 2001; Ochoa y *col.*, 2002).

En la actualidad, está bien establecido que los efectos saludables del aceite de oliva no se concentran únicamente en su contenido en ácidos grasos. La idea fundamental reside en la presencia de compuestos minoritarios bioactivos, fundamentalmente fenoles con alta capacidad antioxidante como el hidroxitirosol (Pérez-Jiménez y *col.*, 2007).

IV.3.1.- HIDROXITIROSOLO Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.

El hidroxitirosol ha demostrado en numerosos estudios que posee capacidad antiaterogénica con una gran potencia antioxidante. Actúa como un potente eliminador de radicales libres como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, etc. Además presenta una fuerte acción quelante de metales como el hierro, con lo que disminuye la aparición de ERO derivadas de reacciones de dicho metal (Visioli y *col.*, 2006; Bovicelli, 2007). Esta característica es precisamente la principal responsable de tal efecto en la aterosclerosis, caracterizada por la entrada de partículas de LDL oxidadas en el interior de la íntima arterial. La oxidación es probablemente debida a la acción de los macrófagos, células endoteliales y de la musculatura lisa. El HT es capaz de prevenir la

oxidación de estas lipoproteínas por parte de los macrófagos, ya que incrementa la capacidad antioxidante de estas células relacionado con los niveles de glutatión reducido (Di Benedetto y col., 2007).

Esta capacidad antioxidante de LDL por el HT es un efecto que ya se intuía desde hace unas décadas. De hecho, Salami y colaboradores encontraron la menor presencia de isoprostanos y TBARS, y por tanto peroxidación lipídica en LDL debido al hidroxitirosol (Salami y col., 1995). Estudios posteriores confirmaron el efecto protector de este antioxidante sobre las lipoproteínas LDL, presentando un papel modulador de la aterosclerosis, tanto en modelos *in vitro* como en animales (Wiseman y col., 1996; Marrugat y col., 2004; González-Santiago y col., 2006; Visioli y col., 2006; Di Benedetto y col., 2007; Rietjens y col., 2007b). Además, se ha constatado que la incubación de plasma con compuestos fenólicos del aceite de oliva (entre ellos el hidroxitirosol) reduce y previene la oxidación de LDL (Leenen y col., 2002).

La lipemia postprandial es un factor de riesgo de aterosclerosis (Covas y col., 2006b) y en este sentido, se ha descrito cómo el HT posee una capacidad hipocolesterolemiaante, disminuyendo los niveles plasmáticos de LDL y colesterol total en ratas alimentadas con dietas altas en contenido lipídico. Además, posibilita una disminución de triglicéridos y un aumento de los niveles de HDL y la capacidad antioxidante plasmática, reduciendo así la oxidación de LDL (Fki y col., 2007; Jemai y col., 2008a; Jemai y col., 2008b).

El efecto antiaterogénico del HT no sólo parece estar relacionado con la disminución de la oxidación de las partículas LDL. Se ha descrito un descenso en la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 en células endoteliales *in vitro* relacionado con la inactivación de NF κ B, AP-1, GATA y NAD(P)H oxidasa (Carluccio y col., 2003; Dell'Agli y col., 2006; Carluccio y col., 2007; Pérez-Jiménez y col., 2007). Además, este antioxidante mejora el estrés oxidativo que deteriora los niveles de óxido nítrico y por tanto la relajación aórtica, incrementando la protección del endotelio vascular (Rietjens y col., 2007a). Sin embargo, no se ha encontrado que el HT incremente la producción de óxido nítrico en células endoteliales, lo cual podría significar que no ejerce su acción de forma directa sobre la óxido nítrico sintasa endotelial (Schmitt y col., 2007). Este aspecto

está en contraposición con lo descrito por González-Correa y colaboradores en ratas, los cuales han observado que el HT aumenta los niveles plasmáticos y aórticos de óxido nítrico (González-Correa y col., 2008b).

A pesar de que todos estos estudios demuestran que el HT está relacionado con la disminución de la placa de ateroma, Acín y colaboradores describen como el hidroxitirosol favorece la lesión aterosclerótica en ratones deficientes de ApoE (Acín y col., 2006).

IV.3.2.- EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS DEL HIDROXITIRO SOL.

Uno de los factores implicados en los procesos trombóticos es la agregación plaquetaria. El hidroxitirosol se podría considerar como antitrombótico, ya que reduce de forma significativa la agregación plaquetaria. Petroni y colaboradores describieron como el HT disminuye la síntesis de tromboxano B₂ en un modelo *in vitro* de plasma rico en plaquetas. Este efecto se debe a una reducción en la producción de eicosanoides derivados del ácido araquidónico (como 12-hidroxi-eicosatetraenoico o 12-HETE) (Petroni y col., 1995). Por su parte, González-Correa y colaboradores recientemente han observado una disminución en la síntesis de tromboxano A₂ mediada por la reducción de su metabolito, el tromboxano B₂. Dicho descenso se debió principalmente a la inhibición de la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX). Para estos autores, dichos efectos antitrombóticos serían ayudados por la disminución en la producción de prostaciclina vascular, efectos similares a los que presenta el ácido acil salicílico (González-Correa y col., 2008a; González-Correa y col., 2008b).

Otros autores han observado que el HT ocasiona una reducción en la producción de leucotrieno B₄ de leucocitos (Petroni y col., 1997; De la Puerta y col., 1999). Por su parte, Dell'Agli y colaboradores han indicado que la reducción de la agregación plaquetaria se debe, además de a todo lo anterior, a la reducción que el hidroxitirosol ocasiona sobre la AMPc y GMPc fosfodiesterasa plaquetaria (Dell'Agli y col., 2008). Otro mecanismo relacionado con esta inhibición de la agregación de las plaquetas es la inhibición selectiva

de la síntesis de eicosanoides por parte de las enzimas 5- y 12-lipooxigenasa (5- y 12-LOX) en leucocitos (De la Puerta y *col.*, 1999; Visioli y *col.*, 2005).

La menor expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 también está relacionada con las propiedades antiinflamatoria y antiagregante plaquetaria del hidroxitirosol (Carluccio y *col.*, 2003; Dell'Agli y *col.*, 2006). También ocasiona una reducción de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) como consecuencia del bloqueo indirecto de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Dicho efecto se produce por la prevención de la activación transcripcional de NF-κβ, IRF-1 y STAT-1α, previniendo la activación de macrófagos J774 de ratón (Maiuri y *col.*, 2005). Se sabe que el hidroxitirosol es capaz de originar aductos arilantes/alquilantes en los residuos de cisteína de NF-κβ. Esta acción del HT sobre dicho factor bloquea la transcripción de las enzimas COX-2 y 5-LOX, reduciendo la síntesis de PGE₂ y por tanto la inflamación crónica asociada a enfermedades como el cáncer (Cornwell y Ma, 2008).

La capacidad antiinflamatoria del HT también ha sido observada en un modelo de osteoporosis postmenopausica y senil en ratas causada por la deficiencia de estrógenos (Puel y *col.*, 2008). En dicho modelo se observó una reducción de la inflamación asociada a estas patologías, previniendo además la osteopenia al aumentar la formación ósea.

El HT también favorece la acción de las células del sistema inmune, protegiendo a los neutrófilos de la oxidación mediada por H₂O₂ gracias a su elevada capacidad antioxidante (O'Dowd y *col.*, 2004). Además, también se ha observado que protege eficazmente el ADN de células mononucleares sanguíneas (Fabiani y *col.*, 2008b) y monocitos periféricos de pacientes con Alzheimer (Young y *col.*, 2008). En este sentido, se han realizado diversos estudios en los que se ha mostrado la protección que ejerce el HT frente al daño genotóxico que los radicales libres producen en el ADN en múltiples líneas celulares humanas (Quiles y *col.*, 2002b; Nousis y *col.*, 2005; Grasso y *col.*, 2007; Fabiani y *col.*, 2008b). Por último, el HT aumenta los niveles citosólicos de Ca²⁺ activando a los linfocitos T y B (Palmerini y *col.*, 2005).

De la Puerta y colaboradores realizaron un estudio en un modelo de ratón con inflamación inducida en la oreja mediante ácido araquidónico y/o ésteres del forbol. Se produjo una disminución en la hinchazón entre un 33-45%, relacionada con la menor infiltración de neutrófilos mediada por la inhibición de la mieloperoxidasa (De la Puerta y col., 2000).

IV.3.3.- EL HIDROXITIRO SOL COMO AGENTE ANTIMICROBIANO.

Desde hace muchos años se ha testado la capacidad del aceite de oliva y del extracto procedente de las hojas del olivo como agentes antimicrobianos, siendo activos frente a *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, etc. (Medina y col., 2006). Al parecer, los principales responsables del efecto antimicrobiano en las aceitunas serían las formas dialdehídicas y descarboximetílicas del ácido elenólico unidas al hidroxitirosol (Medina y col., 2007).

Por su parte, el HT ha demostrado *in vitro* que también posee propiedades antimicrobianas frente a agentes infecciosos del tracto respiratorio y gastrointestinal como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* o *Moraxella catarrhalis*, a unas concentraciones inhibitorias bajas, incluso menores a las de ciertos antibióticos como la ampicilina (Bisignano y col., 1999), además de micoplasmas como *Mycoplasma pneumoniae* (Furneri y col., 2004).

IV.3.4.- ACCIÓN ANTICANCERÍGENA DEL HIDROXITIRO SOL.

El efecto antitumoral del HT se ha estudiado como consecuencia de su capacidad para inhibir la proliferación y favorecer la apoptosis de varias líneas de células tumorales por diversos mecanismos, además de servir como quimiopreventivo por su alta actividad antioxidante. Della Ragione y colaboradores mostraron que el HT es capaz de detener el ciclo celular, reduciendo el crecimiento y proliferación, así como la inducción de la apoptosis en células HL60 (leucemia promielocítica) y HT29 (adenocarcinoma de colon). Se trata de un efecto dependiente de fenotipo, ya que según este estudio no afecta a las

células de colon Caco2 pero sí a los linfocitos (Della Ragione y col., 2000). Sin embargo estos estudios afirman que el HT no produce apoptosis en linfocitos no cancerígenos (Fabiani y col., 2002). Esta disparidad podría ser debida a los diferentes ensayos de apoptosis llevados a cabo por uno y otro grupo de investigación. Della Ragione indica que la apoptosis inducida por el HT es dependiente de la liberación de citocromo c, lo que activa la caspasa efectora 3, indicando dichos autores que esto excluye la vía de receptor muerte Fas, ya que la liberación de citocromo c precede a la activación de la caspasa 8 por parte del receptor Fas (Della Ragione y col., 2000). Que se produzca la liberación de citocromo c no excluye por completo a la activación de Fas, ya que se ha encontrado un nexo de unión entre la apoptosis vía receptores de muerte (FAS/CD95, TRAIL, TNF) y la vía mitocondrial, es decir, entre la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis (Jin y El-Deiry, 2005).

Más adelante, se elucidó que una de las posibles vías por la que el HT ocasiona apoptosis es la activación de c-jun por parte de JNK, que bajo ciertas circunstancias produce la muerte celular, y la inactivación por este antioxidante de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Della Ragione y col., 2002).

Como ya se ha indicado, Fabiani y colaboradores también realizaron un estudio sobre células HL60 demostrando que el HT inhibe la proliferación celular bloqueando la fase G1 del ciclo, con un incremento proporcional de células en la fase G0/G1 y una disminución concomitante en las fases S y G2/M. Los mecanismos que propusieron son los que siguen: 1) bloqueo directo del HT sobre quinasas dependientes de ciclinas (CDK); 2) inducción de los inhibidores de CDKs (Cdkn2a/p16); 3) bloqueo de mensajeros implicados en la proliferación celular como las ERO (Fabiani y col., 2002), produciendo apoptosis y favoreciendo la diferenciación de dichas células HL60 (Fabiani y col., 2006). Recientemente, los mismos autores han descrito que el hidroxitirosol (100 μ M) causa un incremento de p21^{WAF/Cip1} y p27^{Kip1} (inhibidores de CDKs), así como una inhibición de CDK6 en el mismo tipo de células, generando una detención en las fases G2/M y G0/G1, y mostrando también que el HT causa apoptosis en células que están en la fase S (Fabiani y col., 2008a) (*Figura 5*).

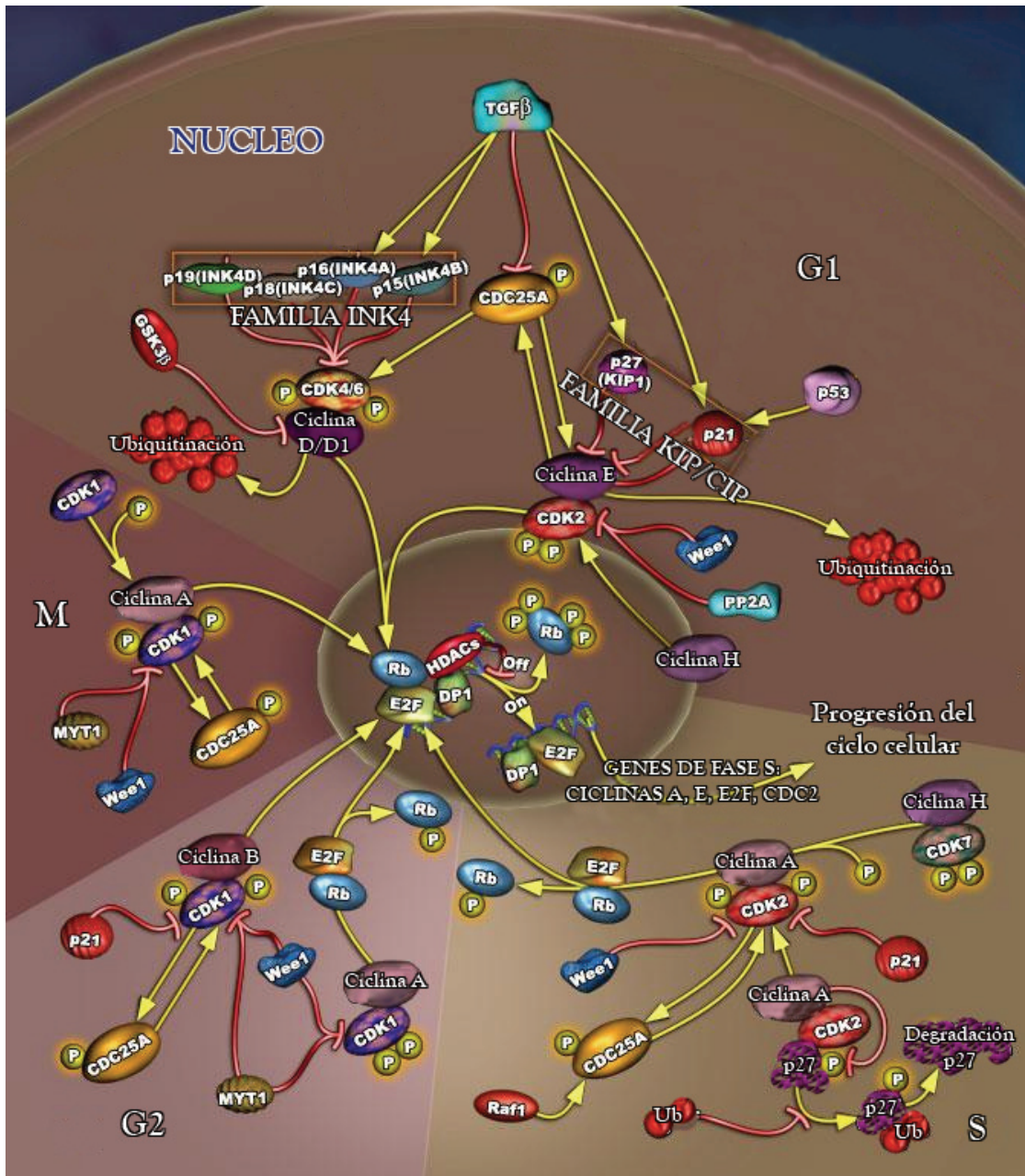


Figura 5. Mecanismos moleculares implicados en el ciclo celular.

Guichard y colaboradores indicaron que el HT produce en células HT29 una detención del ciclo celular en las fases S y G2/M, pero la concentración estudiada era mucho mayor que en el estudio anterior (400 μ M) y las células usadas diferentes. Además, mostraron como el HT originaba una apoptosis dependiente de la inducción de estrés en el retículo endoplasmático. Esta situación conlleva la activación de la vía proapoptótica Ire1/JNK/c-jun/AP-1/Nox-4 (resultados que concuerdan, al menos en parte, con los obtenidos por Della Ragione y col., 2000). Además, se originaba una inhibición de la vía

pro-supervivencia PI3K/Akt/PKB (probablemente por la activación de la fosfatasa serina/treonina PP2A, que inactiva a Akt) y previniendo la activación de NFκB dependiente de TNFα (Guichard y *col.*, 2006).

En células de adenocarcinoma de colon invasivas (HT115) el HT no ha demostrado tener una acción reductora significativa de la capacidad invasora de dichas células (Hashim y *col.*, 2008). Según Corona y colaboradores, el hidroxitirosol ejerce su actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon Caco2 al inhibir la actividad de p38 y CREB (cAMP Response Element Binding protein), y la subsiguiente reducción de la expresión de COX-2 (Corona y *col.*, 2007).

Además de estudiarse los posibles mecanismos por los cuales el HT ejerce sus características antiproliferativas, también se ha mostrado la acción inhibidora de los daños que la radiación ultravioleta ocasiona en células de melanoma (D'Angelo y *col.*, 2005), así como en células de hepatocarcinoma (Hepg2) sometidas a tert-butilhidroperóxido (Goya y *col.*, 2007).

Como ya se ha comentado anteriormente, el hidroxitirosol es capaz de inhibir la expresión de HER2 en células de cáncer de mama resistentes a trastuzumab (Herceptin[®], Roche) que sobreexpresan este oncogén (SKBR3), además de presentar actividad citotóxica sobre dichas células SKBR3, MCF7 (células de cáncer de mama con expresión natural de HER2) y MCF7/HER2 (células de cáncer de mama que sobreexpresan el oncogén). Sin embargo, los mejores resultados se han hallado en estos estudios para la oleuropeína aglicona, que además de tener amplificados estos efectos, también produce apoptosis en las mencionadas células (Menendez y *col.*, 2007). Además, tanto el hidroxitirosol como la oleuropeína se han mostrado como potentes inhibidores de la enzima ácido graso sintasa, enzima clave de la conversión de hidratos de carbono en grasas y que tiene una gran implicación en la carcinogénesis, en células SKBR3 y MCF7 que sobreexpresan el receptor HER2, lo que confiere un alto poder quimiopreventivo (Menendez y *col.*, 2008).

Por último, un mecanismo descrito recientemente implica a las catecol quinonas procedentes del metabolismo del hidroxitirosol y de la reacción con H_2O_2 . Se trata de especies reactivas electrofílicas arilantes que producen aductos de Michael con nucleófilos tiol en glutatión y proteínas. De este modo ejercen sus propiedades citotóxicas, antiinflamatorias y anticancerígenas, muy probablemente debido a la inhibición de NF κ B por estas quinonas. Éstas se unen a los residuos de cisteína formando aductos arilantes/alquilantes e imposibilitando la unión del factor de transcripción con el ADN, que impide de este modo el inicio de la transcripción de COX-2 y 5-LOX, reduciendo la síntesis de PGE₂ y por tanto la inflamación crónica. Además presenta actividad antitumoral (Cornwell y Ma, 2008).

A la vista de los estudios revisados se puede concluir que todo lo que se sabe proviene de estudios *in vitro*, ya que no hay ninguno realizado *in vivo* que demuestre que el HT es capaz de bloquear o disminuir la proliferación y crecimiento tumoral.

V.- MODELOS DE CARCINOGENESIS MAMARIA EN ROEDORES.

Los modelos tanto de ratas como de ratones, han proporcionado una información fundamental para el correcto entendimiento de las alteraciones biológicas, celulares y moleculares implicadas en el desarrollo neoplásico de la glándula mamaria. Los modelos animales presentan características relevantes, así por ejemplo, aquellos químicos desarrollados en ratas son fáciles y reproducibles. Mientras que aquellos que usan ratones presentan la ventaja de poder introducir alteraciones genéticas en la célula epitelial de la mama (Medina, 2007). Hay que destacar que los modelos de carcinogénesis de la mama desarrollada en ratas presentan características que se asemejan al cáncer de mama que se desarrolla en humanos (Shull, 2007).

La importancia de los modelos animales en el campo del cáncer abarca disciplinas variadas como la actividad física. Así por ejemplo, este tipo de modelos han sido muy importantes, ya que los estudios epidemiológicos no aportan información detallada sobre esta asociación causal (Hoffman-Goetz, 2003).

Uno de los aspectos más importantes que deben cumplir los modelos animales *in vivo* es que sean capaces de reproducir, de la forma más exacta posible, la enfermedad humana. Este hecho es imprescindible para elucidar los procesos carcinogénicos mamarios, así como la influencia de factores externos y los propios del huésped sobre el desarrollo neoplásico (Escrich, 1987).

La siguiente sección se resume brevemente en los siguientes epígrafes:

- 1) Modelos obtenidos por ingeniería genética:
 - a) Nulos o deficientes en algún gen.
 - b) Transgénicos.
- 2) Modelos no generados por ingeniería genética:
 - a) Tumorigénesis espontánea.
 - b) Radiación.
 - c) Modelos de implantes/transplantes.
 - d) Modelos químicamente inducidos:
 - o PhIP.
 - o MNU.
 - o DMBA: farmacocinética del DMBA y características histopatológicas del modelo.
 - o Estudios de expresión génica en ratas con cáncer de mama químicamente inducido.

V.1.- MODELOS OBTENIDOS POR INGENIERÍA GENÉTICA.

En las últimas dos décadas, se han creado modelos de cáncer de mama por ingeniería genética para estudiar los mecanismos de formación, invasión y metástasis. Encontramos dos tipos: modelos nulos o deficientes en algún gen y los modelos transgénicos. Los primeros se obtienen tras someter a los animales a mutaciones o deleciones alélicas específicas, constituyendo la herramienta adecuada para estudiar la tumorigénesis en ausencia de supresores tumorales específicos; mientras que los segundos se obtienen al introducir un ADN extraño en el genoma del animal, promoviendo la sobreexpresión tejido-específica de un oncogén para determinar los efectos en la tumorigénesis. Es muy

común la combinación de ambos modelos, lo que ayuda a observar las interacciones que se producen entre múltiples genes, como por ejemplo los modelos bitransgénicos o los que combinan los transgénicos con los nulos o deficientes en algún gen (Blackshear, 2001; Kwon y col., 2007; Shoushtari y col., 2007; Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

En este tipo de modelos hay que tener en cuenta la influencia de la cepa del animal usada (llamada cepa de fondo), ya que contribuye a la aparición de diferencias en la morfología y latencia tumoral. Otro factor a tener en cuenta en los modelos transgénicos es el promotor usado para dirigir la expresión de los transgenes a la glándula mamaria, ya que puede alterar la morfología y fenotipo del modelo. Los promotores usados para dirigir la expresión específica del tejido son predominantemente virus (MMTV, Mouse Mammary Tumors Virus), proteínas (Whey acidic protein o WAP y beta lactoglobulina), metalotionina y C3 (Blackshear, 2001; Kwon y col., 2007; Shoushtari y col., 2007; Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

Los **modelos nulos o deficientes en algún gen** se fundamentan básicamente en la generación de una mutación o una delección de un alelo específico en un gen supresor, lo que produce la pérdida de heterocigosidad tan común en el cáncer de mama humano. Es en este grupo en el que encontramos los ratones *knockout* (en los que el gen en concreto se ha eliminado) y los *knockdown* (aquellos en los que un gen específico presenta una expresión reducida). Las alteraciones más comúnmente introducidas son aquellas que afectan a los supresores tumorales BRCA1, BRCA2 y p53 (Blackshear, 2001; Kwon y col., 2007; Shoushtari y col., 2007; Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

Los **modelos transgénicos** y su combinación con otros (bitransgénicos, nulos o deficientes en algún gen) se usan para explorar el papel que tienen los factores de crecimiento y sus receptores, proteínas transductoras de señales, ciclo celular y metaloproteasas de la matriz. Las características principales de estos modelos son: 1) la sobreexpresión del transgen, junto con otras alteraciones son las que conducen a la aparición de tumores; 2) la latencia y el fenotipo tumoral dependen de la genética de la cepa de fondo, del promotor y del nivel de expresión que alcanza el transgen; y 3) los modelos transgénicos desarrollan una variedad de fenotipos tumorales cuya morfología

no se adapta a los esquemas clásicos (Blackshear, 2001; Kwon y col., 2007; Shoushtari y col., 2007; Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

Se usan diferentes tipos de retrovirus y virus ADN para crear modelos tumorales mamarios transgénicos. Entre estos encontramos el virus MMTV, que induce mutaciones en los genes relacionados con Wnt (Wnt1, Wnt3, Wnt10b), Notch (NOTCH4/int-3) y factor de crecimiento de fibroblastos; el virus Polyoma Middle T, que afecta las señales de transducción de Src, fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) y Ras, y el virus SV40 (simian virus 40), que inactiva *p53* y proteínas de la familia Rb (retinoblastoma). En ratas existe la posibilidad de inyectar adenovirus de tipo 9 (AD9) en la glándula mamaria (Thompson y Singh, 2000).

Se pueden introducir oncogenes relacionados con proteínas de la matriz extracelular (metaloproteasas de la matriz como la matrisilina), factores de crecimiento y sus receptores (HER-2/*neu*, IGF-1), proteínas transductoras de señales (Wnt1, Src, Ras, Akt1) o reguladores del ciclo celular (ciclina D1, *c-Myc*) (Blackshear, 2001; Kwon y col., 2007; Shoushtari y col., 2007; Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

V.2.- MODELOS NO GENERADOS POR INGENIERÍA GENÉTICA.

V.2.1.- TUMOROGÉNESIS ESPONTÁNEA.

Los tumores espontáneos en roedores suceden con una extensión variable y suelen encontrarse en estudios a largo término (Russo y Russo, 1996), como por ejemplo los destinados a la observación de los efectos del envejecimiento. No sólo tienen una baja incidencia tanto en ratones como en ratas, sino que además, hay una alta variabilidad en la incidencia de los tumores espontáneos que más comúnmente aparecen en estos animales (Hoffman-Goetz, 2003).

En el caso de los ratones, la aparición espontánea de tumores mamarios, está relacionada con la infección previa de las hembras con el virus del tumor mamario de ratones (MMTV, Mouse Mammary Tumors Virus) o por provirus endógenos menos virulentos, y no debido a la inyección intencionada de tales virus, razón por la cual, se

encuadran dentro de esta categoría. El tipo de tumores que se desarrollan más comúnmente (muchos de los cuales son hormonodependientes) son los adenocarcinomas, y la respuesta tumorigénica es superior en hembras multíparas que en aquellas estériles (Russo y Russo, 1996). La incidencia de aparición de lesiones en la mama, no sólo varía en función de la capacidad reproductora de las hembras o del estímulo con sustancias exógenas, sino que también influye el tipo de cepa en cuestión. Así por ejemplo, se ha observado una mayor incidencia en ratones C3H que en BALB/c (Hoffman-Goetz, 2003).

La aparición espontánea de tumores mamarios en ratas depende de la cepa, edad y de las influencias endocrinas. Así pues, la incidencia en ratas de edad superior es más alta que en las más jóvenes, en las multíparas que en las estériles, y la suplementación crónica con hormonas, como los estrógenos, incrementa la incidencia de fibroadenomas, como también la administración de hormona del crecimiento o de prolactina, que aumentan la aparición de otro tipo de tumores benignos. Este tipo de modelo es más usual en las hembras de las cepas August, Albany-Hooded, Copenhagen, Fisher, Lewis, Osborne-Mendel, Sprague-Dawley, Wistar y Wistar Furth; sin embargo, el periodo de latencia de este modelo es tan sumamente alto (2 años), que la utilidad en estudios experimentales es muy limitada (Russo y Russo, 1996).

V.2.2.- RADIACIÓN.

La glándula mamaria de la rata es extremadamente sensible a la carcinogénesis inducida mediante radiación. Esta se puede dirigir localmente hacia la mama o bien aplicarse a todo el cuerpo (Thompson y Singh, 2000). El tipo de radiación más ampliamente usado es la ionizante (rayos X o γ), siendo las cepas de ratas Sprague-Dawley y Lewis las más susceptibles, dando lugar a adenocarcinomas o fibroadenomas hormonodependientes (Russo y Russo, 1996).

V.2.3.- MODELOS DE IMPLANTES/TRASPLANTES.

Dentro de este modelos encontramos los siguientes métodos de inducción de cáncer de mama: *ortotópico/xenotrasplante* y *trasplante singénico*.

La **implantación ortotópica** consiste en la implantación de células tumorales humanas en ratones inmunodeprimidos, ya que estos animales no rechazan los trasplantes ortotópicos de células tumorales xenogénicas (cultivos de líneas celulares humanas o bien células procedentes de tumores humanos) o alogénicas (otras cepas de ratones), siendo muy útiles para estudiar el comportamiento metastásico de las células cancerosas (especialmente de origen humano) *in vivo*. El principal problema que tiene el uso de este tipo de animales es que al estar comprometido el sistema inmune se puede afectar el desarrollo y progresión de los tumores, ya que la inmunidad no ejerce ningún efecto sobre la neoplasia como sí ocurre en los humanos. Otra limitación del modelo es el lugar de implantación, así pues, el xenotrasplante se suele hacer en el lateral del ratón, y su microambiente puede alterar el crecimiento y potencial metastásico de las células, mientras que el implante ortotópico se hace en la glándula mamaria, que aunque no afecta el microambiente, hay otros factores como el estroma que la hacen diferente a la humana.

Entre las líneas celulares humanas de cáncer de mama que se usan en los trasplantes encontramos: MCF-7 (estrógeno dependiente), MCF-7/ADR (estrógeno dependiente, resistente a múltiples fármacos), MDA-MB-231 (estrógeno independiente, metastásica), MDA-MB-435 (estrógeno independiente, metastásica), BT-549 (estrógeno independiente), HS578T (estrógeno independiente, metastásica), T47D (estrógeno dependiente), etc. (Clarke, 1997b; Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

Por último, hacer mención a los **animales singénicos**, obtenidos por sucesivos apareamientos de muchas generaciones, tanto que los descendientes son genéticamente idénticos. El ratón (o rata) huésped singénico tolera los trasplantes tumorales que tienen la misma genética de fondo y no tienen limitaciones añadidas a las deficiencias inmunes que presentan (Hoffman-Goetz, 2003).

V.2.4.- MODELOS TUMORALES QUÍMICAMENTE INDUCIDOS.

A lo largo de los años, este tipo de modelos han sido empleados con múltiples propósitos entre los científicos, como en estudios sobre la relación entre el cáncer de mama y la actividad física (Hoffman-Goetz, 2003), grasa de la dieta (Costa y col., 2004), restricción calórica, quimioprevención, (Clarke, 1997a; Shull, 2007), exposición a tóxicos químicos (Russo y Russo, 1996), etc.

El modelo de inducción química cuenta con la posibilidad de ejecutarlo en ratas o ratones. En el caso de los ratones, los agentes químicos usualmente empleados son: 3,4-benzopireno, 3-metilcolantreno (MCA), 7,12-dimetilbenzo(α)antraceno (DMBA) y uretano; mientras que en ratas, las sustancias usadas son: DMBA, MCA, N-metil-N-nitrosourea (MNU), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhIP), etc., sin embargo, los más ampliamente estudiados son aquellos que se basan en la administración de DMBA o MNU (Russo y Russo, 1996; Shull, 2007). El primer problema surge a la hora de la elección del modelo químico, ¿en ratas o en ratones?. Como sugiere Medina, lo primero que hay que tener en cuenta, es que este tipo de modelos usan agentes químicos con escasa evidencia en la etiología del cáncer de mama en humanos, teniendo en cuenta esto, y salvando las diferencias y similitudes entre unos y otros, parece que el empleo de ratas es más sencillo y muy reproducible, con respecto a los ratones, que tienen la ventaja de que permiten estudiar los efectos de los carcinógenos sobre genes específicos (Medina, 2007).

Una vez decidido el uso de un modelo químico en ratas, sigue existiendo un aspecto que genera controversia, y es la elección de uno u otro agente químico. Como ya se ha comentado unas líneas más arriba, los carcinógenos más empleados son el DMBA y el MNU. Ambos compuestos generan tumores muy similares, de hecho, ambos comparten la misma diana estructural dentro de la mama (yema terminal distal o "Terminal End Bud"), y los mismos requerimientos de tamaño en el compartimento proliferativo. Además producen tumores hormono dependientes, generan un nivel similar de daño inducido al ADN, y una similar habilidad de las células para reparar ese daño (Russo y Russo, 1997). Sin embargo, hay diferencias farmacológicas que hay que tener en cuenta

en función del tipo y fin del estudio que se vaya a realizar, como las relacionadas con la necesidad del DMBA de ser previamente activado metabólicamente, mientras que el MNU es de acción directa (Clarke, 1997a).

V.2.4.1.- INDUCCIÓN DE CÁNCER MAMARIO CON PhIP.

Se trata de una amina heterocíclica que se genera durante el proceso de cocinado de las carnes, y se consume a través de la dieta humana hasta niveles que podrían desarrollar cáncer de mama. El PhIP induce neoplasias mamarias en ratas Fisher 344 cuando lo ingieren en la dieta durante un periodo de un año, así como en ratas Sprague-Dawley tras la administración por inoculación intragástrica (gavage) de una dosis de 75 mg/kg/día durante 10 días, entre los 43 y 54 días de edad, y una dieta rica en grasas durante 25 semanas (Shull, 2007).

V.2.4.2.- INDUCCIÓN DE NEOPLASIA EN MAMA CON MNU.

Este compuesto es una nitrosourea capaz de inducir de forma reproducible y específica carcinomas mamarios con una elevada incidencia a una dosis simple, ya sea por vía intravenosa o intraperitoneal. Gullino y colaboradores fueron los primeros en demostrar que el MNU administrado por vía intravenosa a ratas Sprague-Dawley, es muy eficaz para inducir tumores de mama (Gullino y *col.*, 1975). Posteriormente, se ha comprobado que la administración intraperitoneal es también muy eficaz en la misma cepa de ratas (Shull, 2007).

Las características de los tumores que genera son muy similares a los inducidos por el DMBA, sin embargo, la incidencia de tumores más agresivos es mayor en el caso del MNU, aunque raramente metastatizan, característica que comparte con el DMBA (Thompson y Singh, 2000). Como se ha indicado anteriormente, ambos generan lesiones dependientes de hormonas, no obstante, las neoplasias obtenidas tras el tratamiento con MNU son más estrógenos dependientes. Sin embargo, la principal diferencia entre un modelo y otro radica en que el MNU es un compuesto cancerígeno de acción directa, al contrario que el DMBA (Thompson y Singh, 2000). Por último, este modelo favorece la

aparición de Ras activado, es decir, parece que MNU produce mutaciones en Ras para contribuir al proceso carcinogénico ya que aparece en el 80-100% de los tumores, siendo en el codón 12 la mutación más descrita. Por el contrario, en el caso del DMBA, esta activación se da en menor cuantía (25%), pareciendo cada vez más claro que esta mutación no es necesaria para el proceso carcinogénico del DMBA (Clarke, 1997a; Samuelson y *col.*, 2008).

V.2.4.3.- MODELO DE DESARROLLO TUMORAL MAMARIO CON DMBA.

El estudio pionero realizado en 1961 por Huggins y colaboradores demostró que el DMBA induce, con potencia y especificidad en ratas Sprague-Dawley hembra, carcinomas mamarios con una única dosis administrada por vía intragástrica (Huggins y *col.*, 1961).

Este compuesto se caracteriza, a diferencia del MNU, porque él no es el responsable directo de las lesiones que llevan a la transformación neoplásica, sino que necesita ser metabolizado para dar lugar a metabolitos que son los carcinógenos finales. Además, presenta una “ventana de susceptibilidad”, es decir, hay un margen de situaciones y factores en los que la administración de este compuesto genera tumores mamarios con mayor eficacia (Medina, 2007).

En esta dirección, es muy importante el estado de la glándula mamaria, y es que se ha visto que el momento de mayor susceptibilidad es cuando las yemas terminales distales (estructura diana del DMBA) están en desarrollo, momento en el que hay más síntesis de ADN al que unirse y los mecanismos reparadores aún son bajos, como ocurre cuando las ratas son vírgenes (Russo y Russo, 1996; Kubatka y *col.*, 2002; Russo y *col.*, 2005; Medina, 2007). Además de esto, para la correcta génesis de tumores mamarios, se necesita la presencia de factores hormonales tales como hormonas esteroideas y factores del crecimiento, procedentes de los ovarios y placenta (estrógenos, gonadotropina coriónica), hipofisarias (prolactina), insulina, andrógenos, y hormonas tiroideas. Esto prueba que se trata de un modelo dependiente de hormonas, entre ellas estrógenos y prolactina, cuyos receptores se encuentran sobreexpresados en este modelo (Marxfeld y *col.*, 2006a).

Evidentemente, hay factores no hormonales que también tienen importancia, como por ejemplo la diferenciación del tejido mamario, que es un potente inhibidor de la iniciación del cáncer, factores genéticos, dieta, etc., (Russo y Russo, 1996; Russo y col., 2005). En cuanto a la dieta, por ejemplo, Costa y colaboradores evidenciaron que una dieta rica en grasas (concretamente aceite de maíz al 20% en peso) produce un aumento en la agresividad de los adenocarcinomas generados por una dosis de 5 mg DMBA en ratas de 53 días de edad (Costa y col., 2004).

Como hemos anotado anteriormente, la susceptibilidad genética del animal también es influyente, y por supuesto, esto hará que haya cepas más o menos susceptibles. Así pues, las ratas de las cepas no endogámicas de Sprague-Dawley y las endogámicas de Wistar-Furth son más susceptibles que las no endogámicas de Long-Evans y Fisher 344 (Shull, 2007), mientras que las Copenhagen son ratas completamente resistentes (Russo y Russo, 1996). Los animales más ampliamente usados en este modelo son ratas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales han demostrado en varios estudios una alta susceptibilidad a dosis simples y repetidas del carcinógeno. Otro factor a tener en cuenta para este modelo y con esa cepa de ratas, es la diferencia en la incidencia de carcinogénesis mamaria en función de la estación, encontrándose más incidencia tumoral durante las estaciones con días largos que en aquellos meses de invierno con días cortos (Kubatka y col., 2002).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la edad a la que se administra el carcinógeno. Huggins y colaboradores (Huggins y col., 1959) definieron como periodo de máxima sensibilidad al DMBA la pubertad temprana, entre los días 40-60 después del nacimiento. Sin embargo, se ha determinado que los mejores resultados se obtienen cuando se interviene alrededor del día 43 tras el nacimiento, que es el momento en el que hay una mayor densidad de yemas terminales distales (Kubatka y col., 2002).

V.2.4.3.1.- FARMACOCINÉTICA DEL DMBA.

El DMBA es un hidrocarburo aromático policíclico de carácter lipofílico, que tras su administración intragástrica (gavage), tendrá su zona preferente de absorción en el intestino, donde además, se ve favorecida por la presencia de ácidos biliares, y cuyo

máximo de absorción está entre las 3 y las 6 horas tras su administración. Las concentraciones tisulares mayores de DMBA se encuentran en hígado, riñón, y glándula adrenal (siendo a las 4 horas incluso tres veces superiores a las encontradas en las glándulas mamarias). Sin embargo, es en la mama donde se alcanza el pico, por un lado, a las 6 horas en las células parenquimales, y por otro, a las 16 horas en los componentes grasos de la mama de donde se puede ir liberando poco a poco (Clarke, 1997a).

Su metabolización se produce principalmente en el hígado, aunque también en tejido mamario. Cabe destacar que para que la respuesta carcinogénica sea completa, se necesita que la activación metabólica se produzca tanto en hígado como en el resto de los órganos diana tales como la mama (Clarke, 1997a).

De forma general, el DMBA es metabolizado en dos fases, y en cada una de éstas, están implicadas diferentes enzimas detoxificantes de xenobióticos. En la fase I encontramos el citocromo P450 y b₅, y en la fase II las enzimas glutatión-S-transferasa (GST), γ -glutamiltanspeptidasa (GGT) y la DT-diaforasa (DTD) (Kumaraguruparan y col., 2007).

Los pasos fundamentales en la ruta de metabolización del DMBA son (*Figura 6*): 1) formación de diol epóxidos por sucesivas epoxidaciones por las monooxigenasas citocromo P450, concretamente P4501A1 y P4501B1 (Kleiner y col., 2004), y un paso intermedio de hidrólisis catalizado por una epóxido hidrolasa microsomal; 2) oxidación enzimática con la pérdida de un electrón que conduce a intermediarios tipo radical catión mediado por peroxidasas citocromo P450; 3) formación de dihidrodioles que concluye en la obtención de *o*-quinonas redox altamente reactivas por acción de la enzima dihidrodioles-deshidrogenasa, metabolitos todos ellos capaces de reaccionar con el ADN, ARN y proteínas (Russo y col., 1982; Cavalieri y Rogan, 1992; Penning y col., 1999; Melendez-Colon y col., 2000).

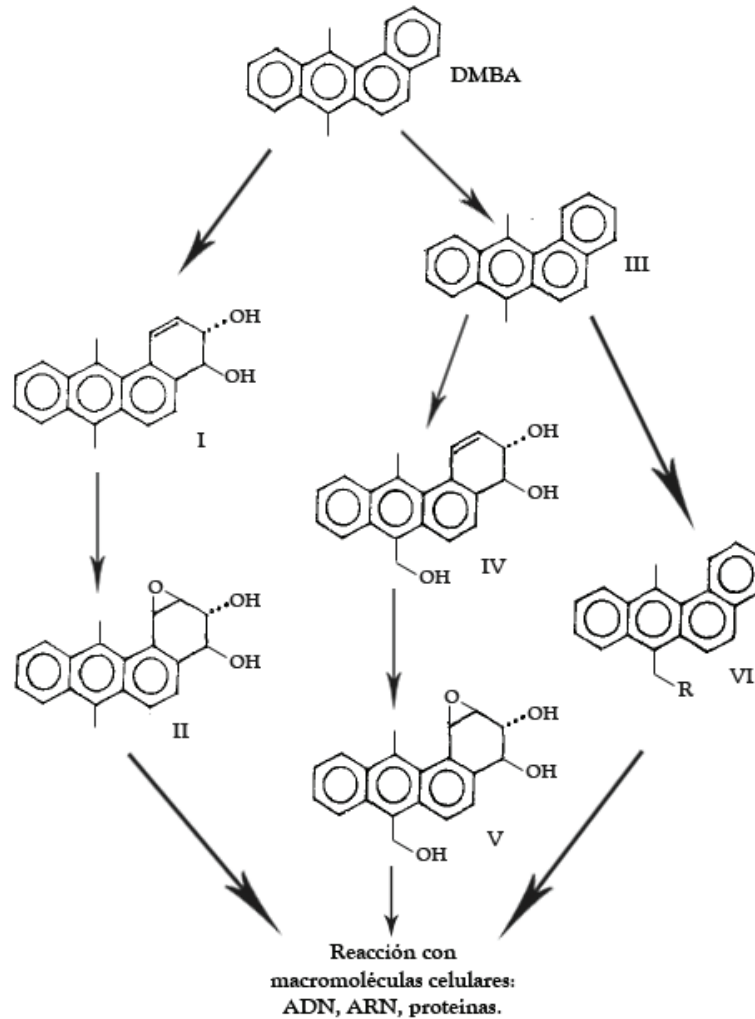


Figura 6. Esquema simplificado que representa las principales vías de metabolismo del DMBA. I (DMBA-3,4-diol); II (DMBA-3,4-diol-1,2-óxido); III (7-OHM-12-MBA); IV (3,4-dihidrodiol-7-OHM-12-MBA); V (3,4-dihidrodiol-1,2-óxido-7-OHM-12-MBA); VI (ésteres reactivos). R puede ser un éster de sulfato o de fosfato). (Adaptado de Russo y col., 1982).

Uno de los órganos diana de metabolismo así como de acción carcinogénica es la mama. En este tejido, al igual que en hígado, el DMBA se metaboliza fundamentalmente a 7-hidroximetil-12-metilbenzo(α)antraceno (7-OHM-12-MBA) y 12-hidroximetil-7-metilbenzo(α)antraceno (12-OHM-7-MBA) (Clarke, 1997a; Russo y col., 1982). El primero es un potente carcinógeno de la glándula mamaria en ratas, y un intermediario que sufre las anteriormente nombradas etapas metabólicas, dando lugar a metabolitos altamente cancerígenos (diol epóxidos, radicales catiónicos y quinonas reductoras).

Una vez que se han generado los metabolitos, éstos son distribuidos por el organismo encontrándose metabolitos polares que, 2.5-3 horas tras la administración constituyen el 60% del total en suero. Este hecho da la idea de que los niveles séricos de DMBA disminuyen rápidamente, pasando de ese 60% a tan sólo el 5% de metabolitos polares a las 6 horas tras la administración.

La excreción se realiza fundamentalmente a través de la ruta biliar, donde se pueden encontrar entre un 96-97% de DMBA en forma de metabolitos (Clarke, 1997a), con lo cual, la eliminación a través de las heces será la vía mayoritaria.

V.2.4.3.2.- HISTOPATOLOGÍA DE LOS TUMORES DE MAMA OBTENIDOS CON DMBA.

Hasta ahora se han revisado una serie de aspectos que presentan los modelos químicos en ratas que se asemejan a los humanos, como por ejemplo la dependencia del estado hormonal, edad, dieta, vida reproductiva, la probable existencia tanto de lesiones benignas como malignas, mutaciones en ras, etc. Sin embargo, existen algunos aspectos diferentes entre ratas y humanos, y es que los tumores inducidos en la rata presentan más frecuentemente un patrón cribiforme y/o papilar, son no-invasivos o microinvasivos y no suelen dar origen a metástasis. Este último concepto es controvertido ya que si aumentamos el tiempo de seguimiento de las ratas con el carcinógeno, la frecuencia de enfermedad metastásica aumenta. Por último, anotar que no desarrollan la enfermedad de Paget, ni carcinomas medulares ni lobulares (Russo y col., 1990; Costa y col., 2002).

En cuanto al sistema de clasificación de las lesiones de mama, en ratas se utiliza la Clasificación de Consenso definida en la reunión de Hanover, Alemania en 1987 (Russo y col., 1990; Costa y col., 2002).

Las similitudes entre las características morfológicas del modelo de carcinogénesis en mama de ratas inducido por el DMBA y las lesiones propias de la mama humana vienen resumidas en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Clasificación de las lesiones mamarias de ratas y su correlación con las lesiones humanas (Adaptado de Costa y col., 2002).

	Lesiones mamarias humanas	Lesiones mamarias de rata
Tumores epiteliales		
Benignos	Adenoma: Tubular Lactante Apocrino Papiloma Papilomatosis florida Otros	Adenoma: Papilar (papiloma) Tubular Lactante Tumores de glándulas salivares
Malignos		
No invasivos	Carcinoma intraductal, con o sin enfermedad de Paget Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
Invasivos	Carcinoma ductal invasivo, con o sin enfermedad de Paget Carcinoma lobular invasivo Carcinoma medular Carcinoma mucinoso Carcinoma tubular Carcinoma papilar invasivo Carcinoma cribiforme invasivo Carcinoma con metaplasia Otros	Adenocarcinoma Carcinoma con metaplasia escamosa Tumores de glándulas salivares
Tumores fibroepiteliales		
Benignos	Fibroadenoma: NOS (Not Otherwise Specified) Juvenil Tumor filodes	Fibroadenoma
Malignos	Tumor filodes	Carcinosarcoma

Costa y colaboradores (Costa y col., 2002) concluyen en su trabajo sobre la caracterización histopatológica de las lesiones inducidas por el DMBA en ratas que, la mayor parte de las lesiones encontradas son tumorales, y de ellas la gran mayoría son malignas, caracterizadas por ser de bajo grado (I y II) con escasa necrosis, microcalcificaciones e infiltrado inflamatorio acompañante del tipo linfoplasmocitario. Cuanto mayor grado presentan los tumores, mayor índice mitótico, necrosis e infiltrado inflamatorio, patrón cribiforme y marcada reacción desmoplásica. En raras ocasiones el carcinoma se puede presentar dentro de una lesión previa benigna no acompañada de reacción estromal o como múltiples nódulos microscópicos malignos sobre estroma fibrótico no tumoral. El patrón predominante es el mixto con mayor cantidad de componente cribiforme. Por su parte, el carcinoma cribiforme de la mama humana, no

debe compararse con los carcinomas de patrón cribiforme de la rata, ya que el primero corresponde a una neoplasia de bajo grado que debe cumplir unos requisitos estrictos diagnósticos que no tiene que ver con la forma habitual de malignización de mama de la rata. Por último, indicar que el diagnóstico diferencial entre la categoría de adenoma, a veces con hiperplasia papilomatosa compleja y quistificación o con proliferación acinar con escaso estroma, y el patrón microcribiforme o el adenocarcinoma convencional es a menudo muy difícil. Esta es la razón por la que para distinguirlos se recomienda aplicar los criterios de malignidad descritos previamente por Young y Hallowes (Young y Hallowes, 1973) y adoptados por Russo y colaboradores (Russo y *col.*, 1990; Russo y Russo, 2000).

V.2.4.4.- ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RATAS CON CÁNCER DE MAMA QUÍMICAMENTE INDUCIDO.

Puesto que en la presente memoria de tesis una parte muy importante de ella gira en torno al perfil genético de los animales del estudio, se hace indispensable dedicar unas líneas a aquellos trabajos que han llevado a cabo determinaciones genéticas en animales con tumores mamarios inducidos mediante compuestos químicos. De éstos, los modelos más ampliamente estudiados desde el punto de vista de perfil genético son los de DMBA, MNU y PhIP.

Hay una gran cantidad de estudios destinados al mapeo genómico de aquellos loci de susceptibilidad, asociados al cáncer de mama experimental en ratas, además de la determinación, mediante técnicas genómicas, de aquellas aberraciones genético-somáticas inducidas por compuestos químicos como el DMBA, MNU o PhIP (Shull, 2007). Sin embargo, el tema que nos ocupa está más relacionado con los perfiles de expresión génica realizados en los modelos DMBA, MNU y PhIP, así como estudios comparativos entre ellos u otros.

En el año 2004, Escrich y colaboradores realizaron un experimento con el fin de encontrar aquellos genes modulados por una dieta con alto contenido en lípidos. Para ello, desarrollaron un modelo de carcinogénesis mamaria inducida por DMBA (5 mg) en

ratas Sprague-Dawley de 40 días de edad alimentadas con una dieta rica en lípidos de la serie n-6 (20% en peso de aceite de maíz). El ensayo de perfil génico realizado con microarrays de ADNc (ADN complementario) y la posterior validación de los resultados mediante RTPCR, mostraron la sobreexpresión del antígeno L6, transferrina y L27a, mientras que como genes con expresión inhibida encontraron la globulina α -2u, VDUP1 (vitamin D₃-upregulated protein), H19, así como una secuencia de función desconocida, descubriéndose una serie de genes potencialmente implicados en la proliferación y diferenciación celular (Escrich y col., 2004).

Más recientemente, se publicó un estudio relacionado con el efecto que tiene el DMBA sobre el tejido mamario antes de que se desarrollen los tumores usando microarrays de ADNc y posterior validación con RTPCR cuantitativa. La dosis usada de DMBA era de 75 mg/kg sobre ratas Sprague-Dawley de 45 días de edad y alimentadas con una dieta rica en grasas (23.5% de aceite de maíz). Este trabajo mostró una serie de genes sobreexpresados relacionados con el crecimiento, diferenciación de la glándula mamaria y adhesión celular, incluyendo Igf1, Igfbp2, PCNA, ligando Kit, chaperonas moleculares (Hsp70, Hsp27, etc.), ciclina D1, α 1tubulina, etc. La mayor parte de los genes inhibidos estaban relacionados con el tejido muscular (troponina, tropomiosina, miosina, etc.), así como con la diferenciación celular (Cryab o crystallin, alphaB; Transferrina y β -caseína) (Papaconstantinou y col., 2006).

Marxfeld y colaboradores también han estudiado el modelo de DMBA, pero en un estudio lo comparan con adenocarcinomas espontáneos y en otro estudio lo comparan con un modelo diferente basado en la inyección de células MTLn3. Estos autores indujeron carcinomas mamarios en ratas Sprague-Dawley de entre 48 y 52 días de edad, con 20 mg de DMBA. A continuación realizaron un estudio de microarrays de ADNc con la plataforma GeneChip[®] de Affymetrix[®] y una posterior validación de los resultados mediante RTPCR cuantitativa (comparan con un modelo u otro). Los resultados de este estudio mostraron que el modelo de DMBA presenta fundamentalmente una expresión alterada de los genes que codifican para factores de crecimiento, proliferación, invasión, desarrollo mamario y marcadores tumorales. En concreto, como genes sobreexpresados se hallaron: GATA3, Fgf1 (fibroblast growth factor 1), Fgf13, ampirregulina, ciclina D1,

Cdkn2a (cyclin-dependent kinase inhibitor 2a), varias metaloproteasas de la matriz, C4.4a (GPI-anchored metastasis-associated protein homolog), Wnt4 y 5a (Wingless-type MMTV integration site family, member 4-5a), Wap (Whey acidic protein), receptores de estrógenos, progesterona y prolactina, y a nivel mucho más bajo β -caseína. Por otra parte, entre los genes inhibidos de mayor relevancia se halló la diana terapéutica de compuestos como la adriamicina, la Top2a (topoisomerase 2a) (Marxfeld y col., 2006a; Marxfeld y col., 2006b).

Shan y colaboradores identificaron una serie de genes que se expresaban diferencialmente en tumores mamarios inducidos en ratas Sprague-Dawley con una dosis de DMBA (50 mg/kg) y 10 dosis de PhIP (75 mg/kg/día) en ratas (F344xSD)F1, preñadas y lactantes, en comparación con glándulas mamarias normales. Entre los genes con una expresión incrementada encontrados en dicho estudio se encontraron Pdgfa (platelet derived growth factor alpha), ciclina D1 y Stat5a (signal transducer and activator of transcription 5A) (Shan y col., 2002). Un estudio posterior llevado a cabo por los mismos autores identificó un conjunto de 86 genes diferencialmente expresados entre los cánceres de mama inducidos por los siguientes carcinógenos: PhIP, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx), DMBA, MNU, y 4-aminobiphenyl (4ABP). Entre ellos volvieron a identificar a Pdgfa, ciclina D1 y Stat5a, aunque también encontraron genes implicados en el crecimiento y diferenciación como el receptor de prolactina, Anxa1 (annexin A1), Kitl (kit ligand), Stat3, además de un menor nivel de expresión de β -caseína, transferrina, Irs1 (insulin receptor substrate 1) y Wap (Shan y col., 2005b). El siguiente estudio con estas características se llevó a cabo para encontrar la diferente expresión génica exhibida entre las lesiones malignas y benignas, demostrando perfiles de expresión génica diferentes, como queda representado con el grupo de 38 genes que se identificaron diferencialmente en aquellos tumores de carcinomas poco diferenciados en comparación con aquellos bien diferenciados (Shan y col., 2005a).

Un año antes del anterior estudio, Shan y colaboradores se interesaron por la susceptibilidad de individuos de la misma especie pero de diferente edad a la carcinogénesis de la mama inducida con 10 dosis orales de 75 mg/kg de PhIP, en ratas Sprague-Dawley adolescentes (43 días) y maduras (150 días). El análisis de microarray de

ADNc y la posterior validación de los resultados con RTPCR semicuantitativa mostraron cambios opuestos en la expresión de genes, asociados fundamentalmente con la diferenciación celular. En concreto, se sobreexpresaron en los animales maduros y se inhibieron en los adolescentes los genes α -, β -, κ -caseína y Wap. En cuanto al perfil de expresión diferencial en adolescentes respecto al momento tras la administración del carcinógeno (3 horas vs 6 semanas), a las 6 semanas aparecieron genes que codifican proteínas ribosomales, genes del proteosoma, chaperonas moleculares de choque térmico, PCNA, y miembros de la superfamilia Ras (Shan y col., 2004).

Kuramoto y colaboradores realizaron un estudio comparativo entre un modelo basado en el DMBA y otro en PhIP, de características similares a los trabajos de Shan. El resultado fue la presencia de PCNA en el modelo de PhIP, y de Tuba1 (α 1tubulina) y Ctsd (cathepsin D) en el de DMBA (Kuramoto y col., 2002).

En cuanto a estudios de perfil génico realizados en modelos de ratas con cáncer de mama inducido con MNU, hay que destacar los llevados a cabo por Chan y colaboradores. El primero de ellos fue realizado en ratas Wistar-Furth de 50 días de edad, y una dosis intraperitoneal de 35 mg/kg en unos individuos o de 50 mg/kg en otros. Los resultados de los microarrays de ADNc mostraron que las muestras eran muy homogéneas entre sí, y que un cuarto de éstas presentaban mutaciones en el codón 12 del gen H-ras. También se observó que al comparar el perfil de expresión génica con muestras humanas, éste se asemeja al cáncer de mama de grado II receptor de estrógeno positivo de humanos (Chan y col., 2005). Más recientemente, el mismo grupo de investigadores han realizado un estudio para ver aquellos genes que se expresan diferencialmente entre tumores *in situ* y aquellos con invasión. Para ello, partieron del mismo modelo que el anterior trabajo de MNU, pero luego trasplantaron esos tumores en ratas singénicas hembra. Los datos derivados del microarray de ANDc mostraron diferencias en la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto, adhesión celular e invasión (Chan y col., 2007).

El modelo de carcinogénesis mamaria usando DMBA ha sido empleado en numerosos estudios con diferentes tipos de citostáticos como el tamoxifeno (Arumugam y

col., 2006; Malejka-Giganti y col., 2007), 5-fluorouracilo (Raa y col., 2007; Stuhr y col., 2008), ciclofosfamida (Ben-Hur y col., 2002; Samy y col., 2006), etc. Sin embargo, con respecto a la adriamicina, los estudios llevados a cabo en este modelo son de hace varios años (Yoshida y col., 1996; Isogai y col., 1998).

VI.- TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.

Antes de comenzar cualquier tipo de tratamiento, es imprescindible definir dos importantes aspectos: el objetivo que pretende alcanzarse y la secuencia que hay que seguir para la consecución de dichos objetivos.

El **objetivo** primario que ha de seguir el tratamiento es la completa erradicación de la enfermedad, si ésta es inalcanzable, la prioridad pasa por la paliación y/o disminución de los síntomas, y la prolongación de la supervivencia así como la conservación de la calidad de vida. Si hay posibilidad de curación, el cáncer se trata lo más intensamente posible, a sabiendas de que en la mayoría de los casos los efectos tóxicos derivados del tratamiento son realmente muy importantes (Sausville y Longo, 2006).

La **secuencia** de administración en oncología clasifica la terapia en:

- 1) *Terapia adyuvante*: consiste en la eliminación local del tumor primario (normalmente con cirugía) y el posterior tratamiento de orden sistémico con fármacos, con el fin de eliminar los restos microscópicos de la enfermedad (Newman y Singletary, 2007).
- 2) *Terapia neoadyuvante*: consiste en el tratamiento sistémico previo a la eliminación local mediante cirugía o radioterapia, con el fin de eliminar primero las posibles micrometástasis y disminuir la masa tumoral primaria (Waljee y Newman, 2007).

Los avances en los sistemas de detección precoz como los sofisticados dispositivos de imagen, ayudan en gran medida a un correcto diagnóstico patológico (Weissleder y Pittet, 2008) aumentando su fiabilidad y facilidad de obtención de muestra, y por tanto, la

calidad de los métodos de tratamiento subsiguientes (cirugía, radio y quimioterapia) (Moulder y Hortobagyi, 2008).

VI.1.- CIRUGÍA.

Esta modalidad tiene una serie de aplicaciones que van más allá del simple tratamiento del cáncer de mama. Así pues, la cirugía se aplica en la prevención (eliminando lesiones premalignas). También se aplica al diagnóstico, recogiendo biopsias de tejido tumoral, principalmente mediante Biopsia con Aguja Gruesa (BAG) que han de ser lo más representativas posibles de la lesión, de modo que permita el diagnóstico por parte del anatomopatólogo, el cual determina el tipo de actuación médica, el pronóstico y la posible respuesta al tratamiento. Es de utilidad en la estadificación tumoral mediante linfadenectomía axilar por niveles a través de la Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela (BSGC). Esta técnica permite la conservación de los linfáticos axilares, con la consiguiente disminución de la morbilidad asociada a la linfadenectomía (linfedema). Finalmente puede aplicarse con fines paliativos, por ejemplo insertando catéteres venosos centrales. Pero sin duda alguna, el objetivo principal de la cirugía es el tratamiento propiamente dicho del cáncer (Sausville y Longo, 2006; Ely y col., 2007).

Existen varios procedimientos aplicados de forma habitual en cirugía (Ely y col., 2007):

- 1) *Cuadrantectomía, tumorectomía parcial o lumpectomía (Tratamiento conservador)*: se elimina el tumor acompañado de un borde de tejido normal (borde quirúrgico libre). Este tratamiento se sigue de 6 semanas de radioterapia para evitar recurrencias. Se trata de una herramienta tan eficaz como la mastectomía radical modificada (Sausville y Longo, 2006) y es el que se realiza en la mayoría de las pacientes con cáncer de mama en estadios I y II (Veronesi y col., 2002).
- 2) *Mastectomía total o simple*: elimina la mama al completo exceptuando los ganglios linfáticos y músculo.

- 3) *Mastectomía radical modificada*: implica la eliminación total de la mama, excepto el músculo, y de los dos primeros niveles de ganglios linfáticos axilares. Este tipo de intervenciones se realizan en aquellas pacientes con tumores de gran tamaño en las que la lumpectomía no garantiza un buen resultado estético o el tratamiento quimioterápico no ha conseguido reducir su tamaño, carcinomas de mama multicéntricos, carcinoma inflamatorio, o en pacientes que no toleran bien la radioterapia (Schwartz y col., 2006).
- 4) *Mastectomía radical*: consiste en la eliminación de mama, ganglios y músculo. Este tipo de intervenciones ya casi no se practican puesto que la anterior tiene una efectividad similar y es menos desfigurante.

Para concluir, aquellas pacientes con cáncer de mama avanzado son objeto de tratamientos quirúrgicos paliativos encaminados a disminuir el dolor, sangrado, infecciones, conservación de estructuras neurovasculares, etc., disminuyendo de este modo la morbilidad de la paciente. Además, se llevan a cabo intervenciones reconstructivas en pacientes sometidas a mastectomías (Alvarado y col., 2007).

VI.2.- QUIMIOTERAPIA.

La quimioterapia se basa en el uso sistémico de fármacos con actividad citotóxica sobre células con una elevada tasa proliferativa, con la esperanza de provocar una regresión o bien enlentecer la progresión o velocidad de crecimiento de la masa tumoral primaria o distal (metastásica). El mayor problema que presentan las drogas que se usan en la quimioterapia es que sus dianas no sólo se encuentran en el tumor, sino que también están en el resto de células del organismo, causando el mismo daño que originan en las células anormales. Así pues, su uso se limita a aquellos casos en los que el resto de modalidades, como la cirugía o radioterapia primaria han fracasado o no son aplicables, o simplemente se emplean como complemento a las anteriores.

El ciclo celular comprende una serie de eventos altamente controlados que conducen a la replicación del ADN y a la división celular. Fases: G1 (preparación para la síntesis o

replicación de ADN), S (ejecución de la síntesis de ADN o duplicación genómica), G2, M (mitosis) y G0 (quiescencia, en el que la célula puede volver a entrar en el ciclo) (Caldon y col., 2006). Las fases G1 y G2 (fases “gap”) son las que se encargan de regular temporalmente el ciclo para el crecimiento celular, monitorización y control del entorno intra y extracelular. La fase G1 es muy importante y su duración dependerá de los factores externos, así, si las condiciones extracelulares son adversas, se retrasa esta fase, pudiendo entrar en la G0, hasta que llega el momento en el que las condiciones mejoran y la fase G1 avanza hasta su paso a la S (Alberts y col., 2002). Hay fármacos denominados específicos de fase, activos sobre el ciclo celular, que eliminan a la célula en una fase determinada del ciclo, pero no dañan a las células en reposo proliferativo (como en las fases G1 o G0). Además hay agentes inespecíficos de fase (como las antraciclinas), que pueden dañar el DNA en cualquier fase del ciclo pero que parecen bloquear la célula en G2/S, antes de la división celular (Sausville y Longo, 2006; Schwartz y Shah, 2005).

Los agentes quimioterápicos que se utilizan para el tratamiento del cáncer se pueden agrupar en tres categorías generales: los que afectan al ADN, los que afectan a los microtúbulos y los agentes con acción específica a nivel molecular. En función del modo de actuación encontramos: agentes de interacción directa con el ADN (formación de aductos de ADN covalente) o agentes alquilantes (ciclofosfamida, cisplatino,...), antibióticos antineoplásicos y tóxicos de la topoisomerasa (actinomicina D o antraciclinas como la adriamicina), efectores indirectos de la función del ADN o antimetabolitos (5-Fluorouracilo, metotrexato, etc.), inhibidores del huso mitótico o agentes antimitóticos (taxanos como el paclitaxel) y agentes orientados a dianas moleculares.

A diferencia de otros tipos de tumores malignos de origen epitelial, el cáncer de mama responde a varios agentes quimioterápicos como son los agentes alquilantes, antraciclinas, taxanos y los antimetabolitos. En el tratamiento de la neoplasia de mama, los oncólogos suelen comenzar con una combinación de fármacos, y posteriormente, si progresa, se continúa con monoterapia. Ante un fracaso de la pauta inicial, la mayoría de los oncólogos utilizan una antraciclina o paclitaxel. De las antraciclinas, la doxorrubicina o adriamicina es la que da los resultados más ventajosos (Sausville y Longo, 2006).

Para finalizar, hay que destacar que de los distintos regímenes quimioterápicos que existen, los más eficaces son aquellos que contienen en su formulación antraciclinas, y que la eficacia es mayor aún cuando tras la quimioterapia se trata con tamoxifeno (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005).

VI.3.- RADIOTERAPIA.

Esta modalidad de terapia se basa en el empleo de radiaciones ionizantes de elevada energía con el fin de destruir cualquier vestigio de un tumor. En algunos casos se tratan incluso las áreas en las que están los ganglios linfáticos, y la extensión va a depender de la cirugía realizada con anterioridad. Entre los diferentes tipos de técnicas de radioterapia encontramos la clásica, que consiste en la aplicación de una radiación de una fuente externa al organismo; también tenemos otras como la braquiterapia, en la que se depositan “pellets” o aglomerados radiactivos en el tejido mamario, cerca del tumor; una variante de ésta última es el conocido como MammoSite[®], que de forma básica consiste en un pequeño tubo fijado a la zona a tratar con un globo, a través del cual se inyecta material radiactivo. (*Figura 7*) (Ely y col., 2007).

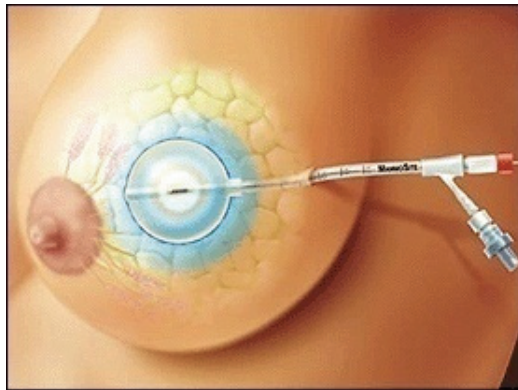


Figura 7. Sistema de radioterapia MammoSite[®].

VI.4.- TERAPIA HORMONAL.

La terapia endocrina se basa en que hay un número extenso de tumores mamarios que son dependientes de hormonas, y precisamente este tratamiento intenta bloquear los

efectos o disminuir los niveles de tales hormonas. Las opciones de esta terapia dependen del estado hormonal de la paciente, ya que la fuente de estrógenos varía en función de si es pre o postmenopáusica, y por tanto también en función de esto podrá modificarse el tratamiento. Así pues, en pacientes premenopáusicas, los estrógenos provienen fundamentalmente de los ovarios, mientras que en aquellas postmenopáusicas los estrógenos proceden de la aromatización de andrógenos en tejidos periféricos como grasa, músculo e hígado (Boughey y col., 2008).

Encontramos varios métodos destinados a bloquear los efectos pro-crecimiento de los estrógenos o para disminuir sus niveles con el fin de tratar el cáncer de mama. Entre los ejemplos destacamos al tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa y los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH o Luteinizing hormone-releasing hormone). Como se ha visto más arriba, el tratamiento dependerá del estado hormonal de la paciente. En este sentido, los inhibidores de la aromatasa en tumores receptores de estrógeno positivos de mujeres postmenopáusicas han proporcionado un incremento en las tasas de respuesta, un mayor control de la enfermedad y menos efectos adversos en comparación con el tamoxifeno. Sin embargo, su uso se limita a pacientes postmenopáusicas. Por su parte, tanto el tamoxifeno como los agonistas de LHRH se usan como terapia inicial en mujeres premenopáusicas (Boughey y col., 2008).

VI.5.- TRATAMIENTO BIOLÓGICO.

El objetivo de la terapia biológica o inmunoterapia es la manipulación de la interacción entre el tumor y el hospedador a favor del último, a través de la alteración de las vías de transducción de señales y todo mecanismo implicado en la proliferación, muerte celular, migración, invasión y metástasis. Como ya sabemos, los tumores son capaces de eludir la regulación por parte del sistema inmune. Los mecanismos a través de los cuales lo logra son: 1) presentando diferencias mínimas con su homólogo normal; 2) regulando negativamente sus antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad; 3) no presentando antígenos de superficie al sistema inmune; 4) recubriéndose con una capa protectora de fibrina reduciendo el contacto con los mecanismos de vigilancia y 5)

mediante la capacidad de producir moléculas solubles que distraen al sistema inmune para que no reconozca la célula tumoral

Existen tratamientos basados en una serie de mediadores biológicos inmunitarios como por ejemplo el aumento de las células inmunes (concretamente linfocitos T) mediante la transferencia de células alogénicas, o bien mediante el uso de vacunas para estimular la inmunidad de las células T. También se puede realizar a través de la eliminación de dichas células inmunes del paciente y la posterior transferencia de estas células previamente reforzadas mediante su cultivo. También está disponible el tratamiento con anticuerpos monoclonales humanizados como el trastuzumab (Herceptin[®]) que actúa frente al receptor HER-2/*neu* y que parece potenciar los efectos de la quimioterapia. Otros ejemplos de este tipo son el anticuerpo bevacizumab para el tratamiento del cáncer de mama metastásico; citoquinas como los interferones y las interleuquinas (IL-2) que han sido sistemáticamente usados en la práctica clínica; una serie de inhibidores y antagonistas de factores de crecimiento implicados en la angiogénesis y metástasis; e inhibidores de tirosinas quinasas (Reang y col., 2006; Sausville y Longo, 2006; Ely y col., 2007).

VI.6.- TERAPIA GÉNICA.

Se trata de una modalidad terapéutica fundamentada básicamente en la integración en el genoma de la paciente de un gen funcional, con el fin de corregir un defecto o proveer a las células de nuevas funciones. Las estrategias seguidas en los protocolos clínicos se pueden dividir en cuatro grupos:

- A) *Supresión de la expresión de oncogenes o transferencia de un gen supresor tumoral*: las opciones de esta modalidad consisten en la transferencia del gen p53 normal, supresión del gen HER-2/*neu*, supresión de los oncogenes c-myc y c-fos o transferencia del supresor tumoral MDA-7.
- B) *Aumento de la respuesta inmune dirigida a las células tumorales*: para ello se transfieren al hospedador citoquinas (IL-2, TNF, etc.), moléculas co-estimuladoras (como el

CD80, estimulador de células T) o genes que cumplen una función antigénica en forma de vacunas, como por ejemplo ocurre con HER-2.

C) *Terapia génica suicida*: se transfieren al tumor genes de enzimas que activan los profármacos quimioterápicos hasta su forma activa, aumentando su concentración en el tejido tumoral y propiciando una mayor apoptosis de las células malignas.

D) *Protección de la médula ósea usando genes de resistencia a fármacos*: de este modo se induce la expresión de proteínas (MDR-1 o “Multidrug resistance 1”) que confieren resistencia a la quimioterapia, alejando a las células sanas de estos fármacos (Takahashi y col., 2006).

VII.- ADRIAMICINA: MECANISMOS, TOXICIDAD Y TERAPIA PREVENTIVA.

La adriamicina (ADR), también conocida como doxorubicina, es una antraciclina antibiótica obtenida a comienzos de la década de los 60 a partir del pigmento producido por *Streptomyces peucetius*, aunque en la actualidad se sintetiza químicamente. Ha sido empleada desde hace más de 30 años en la lucha de una amplia variedad de cánceres, y es un componente esencial del tratamiento de carcinomas de mama y esófago, tumores sólidos de la infancia, osteosarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcomas de tejidos blandos, y linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin (Minotti y col., 2004; Quiles y col., 2006).

Las antraciclinas pertenecen a la familia de fármacos antineoplásicos más efectivos de uso clínico. Concretamente la adriamicina es muy importante en el tratamiento de pacientes con cáncer, aunque su uso se ve limitado como consecuencia de la aparición de efectos tóxicos de carácter agudo y crónico. Los efectos adversos agudos derivados de la administración intravenosa de la doxorubicina aparecen en cuestión de minutos tras la infusión, y entre ellos encontramos náuseas, vómitos, mielosupresión y arritmia. Por otro lado, los efectos crónicos se desarrollan varias semanas o incluso meses después de la administración repetida del fármaco, y entre ellos encontramos daño a corazón, hígado,

cerebro y riñón. Puesto que tanto los cardiomiocitos como las neuronas son células postmitóticas, la mayor parte de las alteraciones que se generan en ellas son irreversibles, afectando de forma irrevocable las funciones de corazón y cerebro. Además, la afectación que se produce en el corazón es mayor ya que es muy sensible al daño ocasionado por los radicales libres, como consecuencia del elevado metabolismo oxidativo y la menor cantidad de defensas antioxidantes que posee. Concretamente, la cardiotoxicidad asociada al tratamiento con ADR puede ocasionar el desarrollo dosis dependiente de cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca congestiva; mientras que a nivel de cerebro, se producen cambios persistentes en la función cognitiva, incluyendo pérdida de memoria y concentración, y dificultad para llevar a cabo múltiples tareas (Quiles y col., 2006; Chen y col., 2007).

La cardiomiopatía crónica dosis dependiente asociada a la administración de ADR cursa con una marcada hipotensión, taquicardia, cardiomegalia y fallo ventricular. A nivel sérico se produce un aumento en la actividad de las enzimas GOT (transaminasa glutamato oxalacética), lactato deshidrogenasa y creatinina fosfoquinasa; mientras que a nivel ultraestructural se observa una pérdida de miofibrillas, vacuolización citoplasmática, dilatación mitocondrial y un aumento en el número de lisosomas (Quiles y col., 2002c; Bertinchant y col., 2003).

La toxicidad que la ADR ocasiona en el cerebro tiene que ver con su acción indirecta ya que de por sí, ésta no es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica. La ADR produce un aumento en los niveles circulantes de TNF α , que sí es capaz de atravesar dicha barrera, alcanzando y activando a las células de la glía para iniciar la producción local de más TNF α , que a su vez induce a la enzima óxido nítrico sintasa para producir ERN, dando lugar a una situación de estrés oxidativo responsable del daño cerebral (Chen y col., 2007).

VII.1.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA ADRIAMICINA.

En este apartado se estudian varios mecanismos propuestos para explicar tanto los efectos anticancerígenos como tóxicos de la ADR, que no sólo valen para el corazón sino

también para otros órganos. La adriamicina actúa a dos niveles: alterando el ADN y generando radicales libres.

VII.1.1.- ALTERACIONES DEL ADN.

Las antraciclinas (entre ellas la adriamicina) se conocen por actuar como **tóxicos de la topoisomerasa II (TOP2)**. Se ha demostrado que la ADR bloquea la síntesis de ADN por que se intercala en la hebra de ADN e inhibe la topoisomerasa II. Esta enzima modifica la topología del ADN sin modificar la estructura ni secuencia de los desoxinucleótidos, causando roturas transitorias de doble hebra para modificar el grado de enrollamiento, y alcanzar así el estado idóneo que necesita el material genético en las distintas fases del ciclo celular y actividad transcripcional.

Para que esta antraciclina ejerza su efecto a nivel de ADN, es estrictamente necesario que alcance el interior del núcleo celular; para ello, tras atravesar la membrana citoplasmática por difusión simple, se une en el citoplasma al proteosoma que lo trasloca hasta el núcleo, donde se une al ADN. La ADR es capaz de unirse a la topoisomerasa II y estabilizar la reacción intermedia en la que las hebras de ADN se cortan y se unen covalentemente a los residuos de tirosina de la topoisomerasa II, creando un complejo ternario ADR-ADN-TOP2 que altera la estructura del ADN e impide su síntesis (Quiles y col., 2002c; Minotti y col., 2004; Quiles y col., 2006; Chen y col., 2007; Ozben, 2007).

Por otra parte, también se ha descrito que la adriamicina **activa a p53, causando apoptosis**. Es posible que este efecto alterante del ADN desencadene una serie de eventos de señalización relacionados con la detención del crecimiento y la activación de p53. De hecho, la activación de este supresor tumoral por parte de la ADR conduce a la célula a la apoptosis, aunque hay que matizar que tal efecto va a depender del tipo de tumor que se trate, ya que hay más cantidad de daño en una célula que presente p53 competente que en una que no. No obstante, el daño genotóxico es muy similar en ambos tipos celulares, y es debido a que las células deficientes en p53 tienen más cantidad de topoisomerasa 2 alfa (que se expresa en la fase S del ciclo), con lo cual hay más intercalaciones de ADR. En el caso de las células que contienen p53, además de la inhibición de TOP2, ese supresor

tumoral bloquea la capacidad ligasa de TOP2 y se aumenta la formación de roturas irreversibles en el ADN.

La apoptosis celular inducida por la ADR se debe a alteraciones genéticas, a la activación de p53, y a otros mecanismos adicionales. Entre estos mecanismos adicionales está la formación de ceramida (que ejerce su efecto apoptótico a través de p53 o de otras rutas corriente abajo como JNK), la degradación de Akt por las proteasas serina-treonina e inhibición de la ruta de señalización pro-supervivencia ejercida por Akt, la liberación mitocondrial de citocromo c, o el incremento de la expresión de ARNm (ARN mensajero) de FasL (ligando de unión al receptor de muerte Fas/CD95). En relación a lo que se está comentando, hay que destacar que la formación de radicales libres por parte de la doxorubicina tiene un papel fundamental, ya que como dijimos anteriormente, los radicales libres pueden favorecer la proliferación o la apoptosis en función del tipo y concentración (Quiles y col., 2002c; Minotti y col., 2004; Quiles y col., 2006; Chen y col., 2007; Ozben, 2007).

Otro mecanismo de acción por el cual la ADR ocasiona genotoxicidad es el relacionado con la **formación de aductos de ADN**. Al igual que en el proceso de apoptosis, ejercen un papel muy importante los radicales libres generados por el fármaco. Entre dichos radicales libres se encuentran los aductos oxidativos procedentes de la peroxidación lipídica, concretamente por la acción del malondialdehído (MDA). También se dan lesiones oxidativas en bases nitrogenadas como 4,6-diamino-5-formamino-piridina (FapyAde) o 5-hidroximetil-uracilo (5-OH-MeUra), que han demostrado ser mutagénicas, al bloquear la replicación del ADN o incrementar la frecuencia de errores de la ADN polimerasa.

Además de este tipo de aductos, hay otros que se producen cuando la ADR genera complejos con el formaldehído por la acción de sistemas con NAD(P)H oxidorreductasas y metales de transición. Dichos complejos forman uniones covalentes con el ADN y, en función de la zona en la que interaccione, se crean intercalaciones menos estables o uniones cruzadas del ADN que son más estables. Una consecuencia probablemente relacionada con tales uniones cruzadas es la imposibilidad por parte de las helicasas de

separar las hebras de ADN, interfiriendo en su desenrollado, aunque tal efecto puede también deberse a una acción directa de la ADR sobre dichas helicasas (Quiles y col., 2002c; Minotti y col., 2004; Quiles y col., 2006; Chen y col., 2007; Ozben, 2007).

VII.1.2.- MECANISMOS RELACIONADOS CON LOS RADICALES LIBRES.

La generación de radicales libres y el estrés oxidativo está íntimamente implicado en la acción de la ADR, tanto en relación con el efecto antitumoral como en lo relativo a la toxicidad. Como ya se ha comentado anteriormente, la doxorubicina es capaz de producir daños en el ADN a través de los productos relacionados con el estrés oxidativo, que junto con otros mecanismos llevan a la apoptosis tanto de las células tumorales como de las sanas existentes en resto del organismo.

Hay tres vías diferentes de formación de radicales libres por parte de la ADR (*Figura 8*):

- 1) *Generación de Semiquinona*: la ADR es transformada en un radical libre de tipo semiquinona vía reducción de un electrón por enzimas reductasas dependientes de NAD(P)H del complejo I de la cadena transportadora de electrones. La semiquinona formada reacciona con el oxígeno molecular para producir radical superóxido, que convierte a la ADR otra vez en quinona. Este ciclo quinona-semiquinona genera grandes cantidades de $O_2^{\bullet -}$, que posteriormente influirá en la producción de ERO y ERN como H_2O_2 , HO^{\bullet} y $ONOO^{\bullet}$.
- 2) *Mecanismo no enzimático*: además de lo anterior, esta antraciclina interfiere con reacciones metabólicas no enzimáticas en las que interviene el hierro, conduciendo a la generación de ERO. Así, la ADR semiquinona, $O_2^{\bullet -}$ y su subproducto H_2O_2 , pueden promocionar la liberación de hierro de los depósitos de ferritina y de la aconitasa citoplasmática, alterando el metabolismo del hierro, y conduciendo a la reacción de este metal con la ADR, dando lugar a HO^{\bullet} .

3) *Productos del metabolismo de ADR*: este metabolismo lleva a la generación de ERO por sí mismo. Por un lado, las aldoceto reductasas convierten el grupo carbonilo del carbono 13 de la ADR en un grupo hidroxilo, dando lugar a un alcohol secundario (doxorubicinol) que es capaz de liberar hierro de la aconitasa citoplasmática, alterando el metabolismo del hierro y por tanto, generando un estrés oxidativo *a posteriori*. Por otra parte, puede ser metabolizada a una aglicona lipofílica que difunde a través de la membrana mitocondrial, acumulándose en la interna; esta aglicona es el punto de partida de una serie de reacciones que liberan electrones, llevando a la generación de ERO y deteriorando la integridad funcional de la cadena transportadora de electrones.

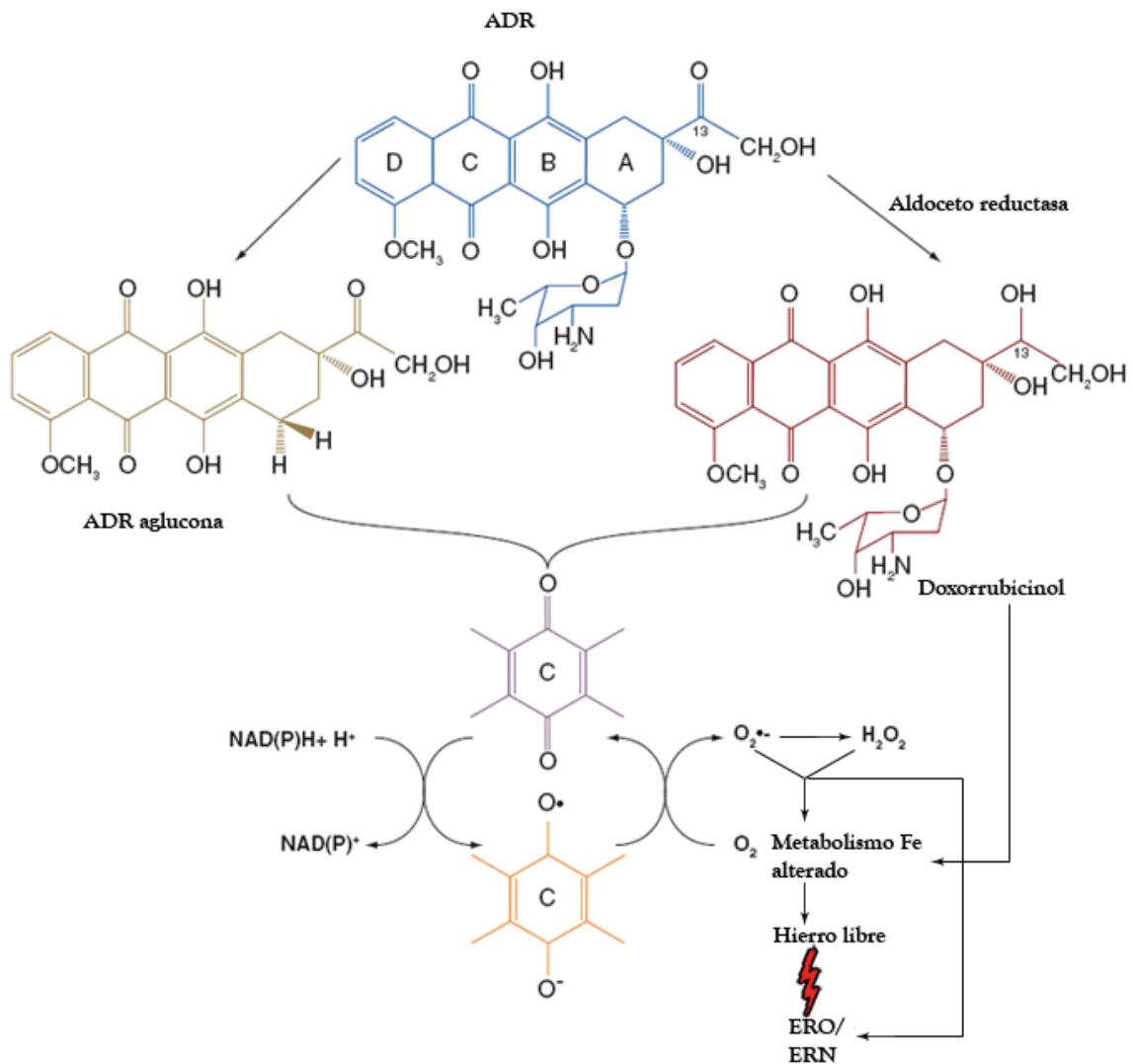


Figura 8. Mecanismos de producción de ERO/ERN inducidos por la adriamicina (Adaptado de Chen y col., 2007).

Estos mecanismos oxidativos descritos son los que la ADR ejerce tanto en su acción antitumoral sobre las células cancerosas, como sobre los cardiomiocitos. Además de ellos, hay que tener en cuenta que el corazón es un órgano muy rico en mitocondrias, las cuales contienen en la membrana interna un fosfolípido llamado cardiolipina, y sobre la que la ADR tiene una gran afinidad, acumulándose ésta en el interior de las mitocondrias cardíacas, razón por la cual aumentan enormemente los procesos oxidativos sobre la ADR.

El tratamiento con ADR también ocasiona una serie de modificaciones que están relacionadas con la cardiotoxicidad, como por ejemplo la alteración del metabolismo del calcio. Estas alteraciones incluyen un incremento en el calcio intracelular, acumulación en el miocardio ventricular e inclusiones de calcio en las mitocondrias, transformaciones en el transporte y en la función liberadora de calcio del retículo sarcoplásmico, ya que afecta a los canales iónicos. Por último, un posible mecanismo descrito de toxicidad de la doxorubicina es la alteración del metabolismo de las prostaglandinas (Quiles y *col.*, 2002c; Minotti y *col.*, 2004; Quiles y *col.*, 2006; Chen y *col.*, 2007; Ozben, 2007).

VII.2.- TERAPIA PREVENTIVA.

Esta terapia se refiere al uso de sustancias u otras estrategias encaminadas a la prevención/protección de aquellos efectos tóxicos derivados del uso de la ADR en el tratamiento del cáncer. Entre ellas encontramos la optimización de las pautas de dosificación (dosis acumulada de 450-550mg/m² mediante infusión continua) (Yeung y *col.*, 2002), así como la síntesis y uso de análogos con actividad equivalente pero menos tóxicos, además de todos aquellos procedimientos destinados a la reducción de los radicales libre formados. Dentro de este último grupo encontramos algunos como el dexrazoxano, sustancia con la capacidad de quelar el hierro liberado por la ADR, disminuyendo de este modo todas aquellas reacciones en las que están implicados ambos factores y que conducen a la producción de ERO (Della Torre y *col.*, 1999a; Della Torre y *col.*, 1999b; Minotti y *col.*, 2004; Chen y *col.*, 2007; Xiang y *col.*, 2008).

Por su importancia clínica y social creciente, nos centraremos en el uso de aquellos compuestos de origen alimentario que han demostrado ejercer efectos protectores ante la toxicidad de la doxorubicina, debido a la alta capacidad antioxidante que presentan. Antes de continuar es necesario hacer una apreciación a este respecto, y es que, hay controversia en cuanto al uso de sustancias antioxidantes en conjunto o previa administración de la adriamicina. Se ha postulado que dichos antioxidantes pueden disminuir la acción antitumoral al eliminar el componente oxidativo relacionado tanto con la acción antineoplásica como con la tóxica, protegiendo de los efectos adversos pero disminuyendo la eficacia del fármaco. No obstante, cada vez son más los autores que opinan que como las antraciclinas ejercen algunas acciones por vías adicionales a la del estrés oxidativo, el uso de estos antioxidantes no debería disminuir su eficacia, reduciendo además los efectos tóxicos asociados. Esta afirmación ha de ser matizada, ya que ni todos los antioxidantes interfieren negativamente con la ADR, ni todos carecen de efectos adicionales, es decir, se encuentran sustancias que sinergizan con la acción de la doxorubicina y además disminuyen la toxicidad (Ozben, 2007).

VII.2.1.- ADRIAMICINA Y ANTIOXIDANTES.

La **vitamina E** es un compuesto con una elevada actividad antioxidante y una importante función biológica, protegiendo a las células del daño oxidativo, fundamentalmente peroxidación lipídica en membranas y lipoproteínas. De forma general, los estudios preclínicos muestran que la vitamina E tiende a incrementar la acción antitumoral de la ADR, además de ofrecer protección frente a la toxicidad de ésta. Este compuesto aumenta la vida media de los animales y disminuye la pérdida de peso asociada a la quimioterapia, protege de la cardiotoxicidad tanto aguda como crónica, aumenta las defensas antioxidantes del corazón, disminuye la peroxidación lipídica, a elevadas dosis reduce las aberraciones cromosómicas, etc. También se ha visto que mejora la nefrotoxicidad derivada del uso de ADR, y tiene efectos positivos frente a las ulceraciones de la piel, disminuyendo la agresividad y acelerando su regeneración. En contraste, los estudios clínicos sugieren que la vitamina E no protege del desarrollo de cardiotoxicidad crónica inducida por la doxorubicina (Conklin, 2000; Quiles y col., 2002c; Quiles y col., 2006).

Por otra parte, la **vitamina C** es un buen antioxidante soluble en agua eficaz frente a la peroxidación lipídica, eliminando las ERO en la fracción acuosa antes de que se produzca la oxidación de los lípidos. Los estudios preclínicos presentan controversia ante este compuesto, aunque de forma general se desprende de ellos que el ácido ascórbico no incrementa la actividad antitumoral de la ADR, pero que sin embargo aumenta la vida de los animales tratados, y disminuye los efectos tóxicos. Probablemente, la variedad de resultados que se encuentran se deba a que la vitamina C a elevadas dosis presenta capacidad prooxidante (Conklin, 2000; Quiles y col., 2002c; Quiles y col., 2006).

Los **carotenoides** como el β -caroteno es capaz de aumentar la acción antitumoral de la doxorrubicina y disminuir la peroxidación lipídica. El retinol también reduce significativamente los niveles de peroxidación lipídica, pero no potencia el efecto antitumoral de la ADR. La **vitamina A** por su parte, también tiene la capacidad de atenuar la peroxidación lipídica asociada al tratamiento (Conklin, 2000; Quiles y col., 2002c; Quiles y col., 2006).

La **ubiquinona (Coenzima Q₁₀)** cumple un papel muy importante dentro de la mitocondria ya que tiene funciones en la cadena respiratoria mitocondrial, siendo un componente esencial en las cadenas redox extramitocondriales. La adriamicina origina cardiotoxicidad asociada a la lipoperoxidación en las células miocárdicas, además, reduce el contenido de CoQ₁₀ de las membranas mitocondriales, inhibe las enzimas de la cadena de transporte de electrones dependientes de CoQ₁₀, e inhibe la biosíntesis mitocondrial. Por estas razones, los estudios preclínicos han visto que tanto la suplementación como el tratamiento previo a la ADR con CoQ₁₀ disminuyen la peroxidación lipídica y la toxicidad cardíaca en general, y no interfiere con la actividad antitumoral de la doxorrubicina. Los estudios clínicos muestran el efecto protector del CoQ₁₀ frente a la cardiotoxicidad crónica asociada a la administración de antraciclinas (Conklin, 2000; Quiles y col., 2002c; Quiles y col., 2006).

Los **flavonoides** se caracterizan por su alta capacidad antioxidante, y han sido considerados como protectores potenciales de la cardiotoxicidad crónica causada por la ADR. Estos flavonoides se caracterizan porque inhiben los efectos negativos de la

doxorubicina sin afectar su capacidad antitumoral, como por ejemplo, el 7-monohidroxiethylrutósido (monoHER). Además, esta capacidad protectora tiene mucho que ver con sus propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales libres, y los mecanismos a través de los cuales ejercen tales efectos son muy variados. Así por ejemplo, la catequina tiene efecto cardioprotector a bajos niveles, concentración a la que presenta actividad quelante de hierro. Otros como la quercetina, además de su alta capacidad antioxidante, inhibe la TOP2 y se intercala en el ADN, incrementando este efecto (que también ejerce la ADR). También inhibe varias proteínas quinasas y aumenta la concentración de adriamicina en las células tumorales resistentes al bloquear las bombas de eflujo de fármacos como la glucoproteína-P.

Hay dos mecanismos bioquímicos fundamentales de acción de estos compuestos que aumenta la capacidad antitumoral cuando se dan en conjunción. El primero es la inhibición del metabolismo intracelular del fármaco, y el segundo el bloqueo de los mecanismos encargados de eliminarlo de la célula. Así por ejemplo, **polifenoles** del té o del café como la cafeína o **catequinas** como la epigallocatequina galato producen un aumento intracelular del fármaco antitumoral al inhibir los mecanismos de eliminación del mismo. La suplementación oral con ajo disminuye el estrés oxidativo producido por la administración crónica de ADR, y protege a las células frente a los radicales libres que produce.

Otros compuestos como la **ginesteína**, isoflavona presente en la soja con alta capacidad antioxidante, es capaz de aumentar los niveles de enzimas antioxidantes como glutatión o superóxido dismutasa, mitigando la producción de ERO. Además, es un inhibidor de la TOP2 e inhibe su unión al ADN, ejerciendo de este modo una acción antineoplásica adicional a la ADR, que unido a la inhibición de varias proteínas quinasa, nos muestra su capacidad apoptótica, además de aumentar la concentración de doxorubicina en células resistentes.

La **curcumina** es un compuesto fenólico que presenta una importante capacidad antioxidante a nivel de LDL, ácidos grasos poliinsaturados, etc., mostrando una gran prevención de los daños renales generados por la ADR, así como de la cardiotoxicidad

aguda, y la disminución de la peroxidación lipídica en corazón, aumentando los antioxidantes endógenos (Conklin, 2000; Quiles y col., 2002c; Quiles y col., 2006).

El **selenio** ha demostrado en estudios *in vitro* que incrementa la apoptosis y disminuye la síntesis de ADN cuando se da en conjunción con ADR. No obstante, cuando hablamos de cardioprotección en estudios animales los resultados son contradictorios. Estudios en animales demuestran que la inyección intraperitoneal de **glutación** reduce la toxicidad miocárdica sin interferir en la actividad antineoplásica de la ADR. Por su parte, la **glutamina** administrada en los días 1 y 28 de la quimioterapia con doxorubicina reduce significativamente la severidad de la estomatitis y diarrea, disminuyendo también su duración. Por último, la **N-acetilcisteína** reduce la cardiotoxicidad aguda en ratones probablemente asociado a su capacidad antioxidante o bien porque aumenta los niveles intracelulares de glutación, sin embargo no protege frente a la toxicidad cardíaca crónica en perros (Conklin, 2000; Quiles y col., 2002c; Quiles y col., 2006).



Material y métodos

I.- MATERIAL.

I.1.- APARATOS DE USO GENERAL.

- *Agitador de microplacas* Shaker PSU2T Plus. BOECO (Alemania).
- *Agitador magnético con calefactor* AGIMATIC-E. JP-SELECTA, S.A (Barcelona, España).
- *Balanza digital* GRAM PRECISION (Gram Precision, SL. Barcelona, España).
- *Balanza electrónica de precisión* SARTORIUS BP110S (Sartorius AG, Göttingen, Alemania).
- *Baño seco digital* (LABNET INTERNATIONAL, Inc. Woodbridge, NJ, EEUU).
- *Baño termostatzado de metacrilato* P-SELECTA (JP-Selecta, SA. Barcelona, España).
- *Calibre electrónico* pie de rey digital AFORA (Afora, S.A. Barcelona, España).
- *Cámara* HITACHI (Standard Video with Meteor II).
- *Centrífuga* refrigerada de mesa BECKMAN mod GS-6R (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, EEUU).
- *Columna capilar* FUSED SILICA SP-2330 de 60 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.20 mm de espesor de fase estacionaria.
- *Congelador de -20°C* LIEBHER (LIEBHER, Biberach, Alemania).
- *Congelador de -80°C* REVCO (REVCO, Asheville, NC, EEUU).
- *Cubetas de electroforesis* CONSORT (Belgium).
- *Detector de diodo array* (System Gold Diode Array Detector Module 168) BECKMAN (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU).
- *Detector electroquímico coulométrico* ESA Coulochem III (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU).
- *Estufa* MEMMERT (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemania).
- *Fuente de alimentación* CONSORT E802 (300V-2000mA) (Bélgica).
- *Inyector automático* WATERS™ 717 Plus (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU).

- *Lector de microplacas* SYNERGY HT, *Multi-Detection Microplate Reader*, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- *Máquina productora de hielo* SCOTSMAN AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, EEUU).
- *Microcentrífuga* para eppendorfs HETTICH EBA12 ZENTRIFUGEN (HettichLab GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania).
- *Micropipetas electrónicas* EPPENDORF RESEARCH® PRO. EPPENDORF AG (Hamburgo, Alemania).
- *Microscopio-UV* Leica DMLS con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400 (Leica Microsystems. Nusstoch, Alemania).
- *pH-metro* GLP 21, CRISON (Barcelona, España).
- *Pipetas automáticas* NICHIPET EX (Nichiryō, Tokio, Japón).
- *Vortex* VWR (VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España).

I.2.- SOFTWARE ESPECÍFICOS.

- *Gene Five* para lector de microplacas SYNERGY HT, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- *Kinetic Imaging Komet 5.5* (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, Reino Unido).
- *SPSS 15.0* para Windows.
- *System Gold® HPLC* (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU).

I.3.- MATERIAL PARA EL ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO.

- *Agua destilada* estéril (Fresenius Kabi AG, Sevres, Francia).
 - *Anticuerpo primario* anti-Ki67 procedente de conejo, clon SP6 (Máster Diagnóstica S.L., Granada, España).
 - *Baño histológico* para inclusión en parafina Termofin (JP Selecta, Barcelona, España).
 - *Cuchillas* para microtomo de 250 µm de grosor (Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japón).
-

- **Equipo de inmunotinción** automática Autostainer Plus Link (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Equipo de recuperación antigénica** PT Link (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Equipo de tinción** automática Leica Autostainer XL (Leica, Wetzlar, Alemania).
 - **Estufa** Incubat (JP Selecta, Barcelona, España).
 - **Etanol 100%** (Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado QP, Panreac Química SA, Barcelona, España).
 - **Hematoxilina** para tinción inmunohistoquímica Dako Automation Hematoxylin Histological Staining Reagent (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Isoparafina H** (Isoparafina H -Sustituto de Xileno- DC, Panreac Química SA, Barcelona, España).
 - **Medio de montaje** (Medio de Montaje para sustitutos de xileno DC, Panreac Química SA, Barcelona, España).
 - **Microscopio óptico** ECLIPSE E600 (Nikon Co., Tokio, Japón).
 - **Microtomo** Leica RM2235 (Leica, Wetzlar, Alemania)
 - **Montador automático** Leica CV5030 (Leica, Wetzlar, Alemania).
 - **Placa fría** Leica EG1150C (Leica, Wetzlar, Alemania)
 - **Portaobjetos** para inmunohistoquímica Dako REALTM Capillary Gap Microscope Slides (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Sistema de detección** inmunohistoquímica Dako RealTM EnVision System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - Software para el equipo de inmunotinción automática DakoLink, versión 1.5.2.1 (System Dynamics, New Jersey, USA)
 - **Solución bloqueante** de peroxidasa DakoCytomation Peroxidase Blocking Reagent (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Solución de lavado** Dako Wash Buffer 10X (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Tampón de desenmascaramiento** antigénico Dako Target Retrieval Solution, pH 6 (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
 - **Tampón de desenmascaramiento** antigénico Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (Dako Denmark A/S, Dinamarca).
-

I.4.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se emplearon 44 ratas hembra (*Rattus norvegicus*) vírgenes de la raza Sprague-Dawley de 8 semanas de edad, con un peso medio de 170 ± 20 g procedentes de Harlan Interfauna Ibérica S.L (Barcelona, España) enjauladas en grupos de cuatro y mantenidas en una habitación termorregulada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) con un periodo de luz/oscuridad de 12h:12h.

Se les suministró agua y dieta comercial de mantenimiento para roedores 2014 de Harlan Interfauna Ibérica S.L (Barcelona, España) *ad libitum*. El peso de los animales fue controlado semanalmente desde su llegada hasta el momento del sacrificio.



Figura 1. Imagen del mantenimiento de los animales.

II.- MÉTODOS.

II.1.- MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENÉISIS MAMARIA.

Debido a la facilidad de manejo de los animales, a que no se necesitan unas condiciones de total asepsia, ni unas instalaciones determinadas para su mantenimiento, a la simplicidad para conseguir la enfermedad tumoral mamaria, a los buenos resultados que se obtienen, y porque no decirlo, al menor coste, el trabajo que aquí se presenta ha

sido desarrollado íntegramente mediante un modelo químico aplicado a ratas Sprague-Dawley hembras.

Los carcinógenos químicos de uso más común en este tipo de estudios son el DMBA y el MNU. Por razones obvias no podemos usar los dos, con lo que el problema que se presenta está en la toma de decisión de cuál de ellos utilizar para nuestro estudio.

II.1.1.- ELECCIÓN DEL CARCINÓGENO QUÍMICO.

En base a los datos obtenidos de la literatura, tal y como se resume en las *Tablas 1 y 2*, se han establecido dos modelos de inducción de cáncer de mama: con DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene $\geq 95\%$, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU) (*Figura 2*) y con MNU (N-Nitroso-N-Methylurea, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU) (*Figura 3*).

Tabla 1. Modelos de carcinogénesis mamaria DMBA-inducidos: estudios en ratas.

Raza	Tiempo comienzo tratamiento (días)	Duración tratamiento (desde inicio)(semanas)	Dosis	Vía	Tipo de lesión	Referencia
SD	?	13	20mg(4x5mg)	O/g	Tumor	National Toxicology Program, 1999
		13	8mg(2x4)	O/g	Tumor	
		26	10mg(1dosis)	O/g	Carcinoma	
SD	53	29	5mg/1ml aceite de maíz	i.g	Carcinoma	Costa y col., 2002
SD	44-47	23	10mg/1ml aceite sésamo	i.g	Tumor	Fedrowitz y col., 2002
SD	53	30	5mg/1ml aceite de maíz	O	Adenocarcinoma	Solanas y col., 2002
SD	55	16	80 mg/kg/día	O	Tumor	Kaufmann y col., 2003
SD	50	11	100 mg/kg	O/g	Tumor	Todorova y col., 2003
SD	47	17	10mg	O	Adenocarcinoma	Cabanes y col., 2004
SD	49	9	5 mg/0.2ml aceite de oliva	O	Tumor	El-Bayoumy y Sinha, 2004

SD. Sprague-Dawley; O. Vía Oral; O/g. Vía Oral/Gavage; i.g. Vía Intragástrica

Tabla 2. Modelos de carcinogénesis mamaria MNU-inducidos: estudios en ratas.

Raza	Edad (días)	T° Comienzo Tratamiento (días)	Duración Tratamiento (semanas)	Dosis (mg/kg)	Vehículo	Vía	Tipo de Lesiones	Referencia
SD	21	33, 40, 47, 54 y 61	12	50x5	NaCl 0.9% (pH 4)	i.p	Carcinoma (60-76%)	Liska y col., 2000
SD	50	50	5-7-9-12	50	Solución salina acidificada (pH 5.0)	i.v (yugular)	Carcinoma	Mehta y col., 2000
SD	42	50	?	50	Solución salina (pH 5.0)	i.v (yugular)	Carcinomas	Shilkaitis y col., 2000
Zucker	35	50	29	Delgadas: 37.5 Obesas: 20	Salino normal (0.9% NaCl, p/v) 0.05% ácido acético	i.p	Carcinoma muy invasivo y otros	Lee y col., 2001
SD	?	43-50	6 a 9	50x2 (una semana entre cada dosis)	Salino estéril acidificado (pH 5.0)	i.p	Carcinoma	Christov y col., 2003a
SD	43	43-50	6 a 9	50x2 (una semana entre cada dosis)	Salino estéril acidificado (pH 5.0)	i.p	Tumor	Christov y col., 2003b
SD	21	21	14, 2	50	Salino (0.05% ácido acético) (pH 4)	i.p	Tumor	Lee y col., 2003
SD	20	21	13	75	Salino fisiológico (0.05% ácido acético)	?	Carcinoma	Allred y col., 2004
Wistar	?	50, 80, 110	17	50x3	Agua destilada (10mg/ml)	i.p	Tumor	Carrera y col., 2004

SD. Sprague-Dawley; i.p. Vía Intraperitoneal

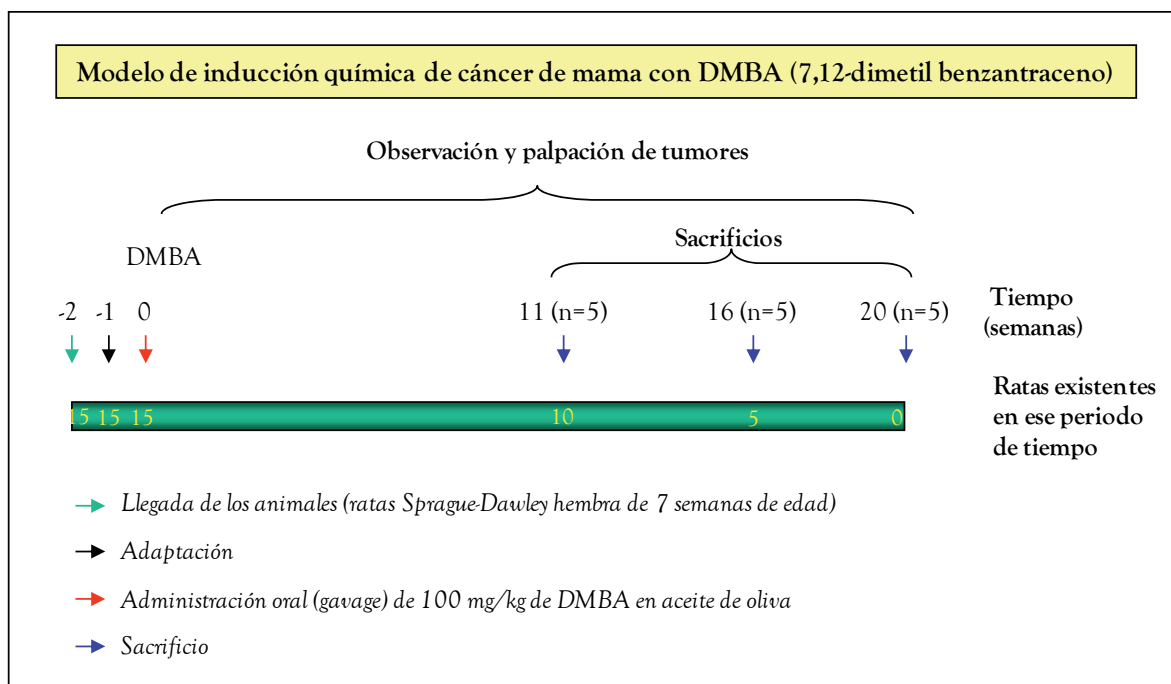


Figura 2. Modelo de DMBA para la elección del carcinógeno químico.

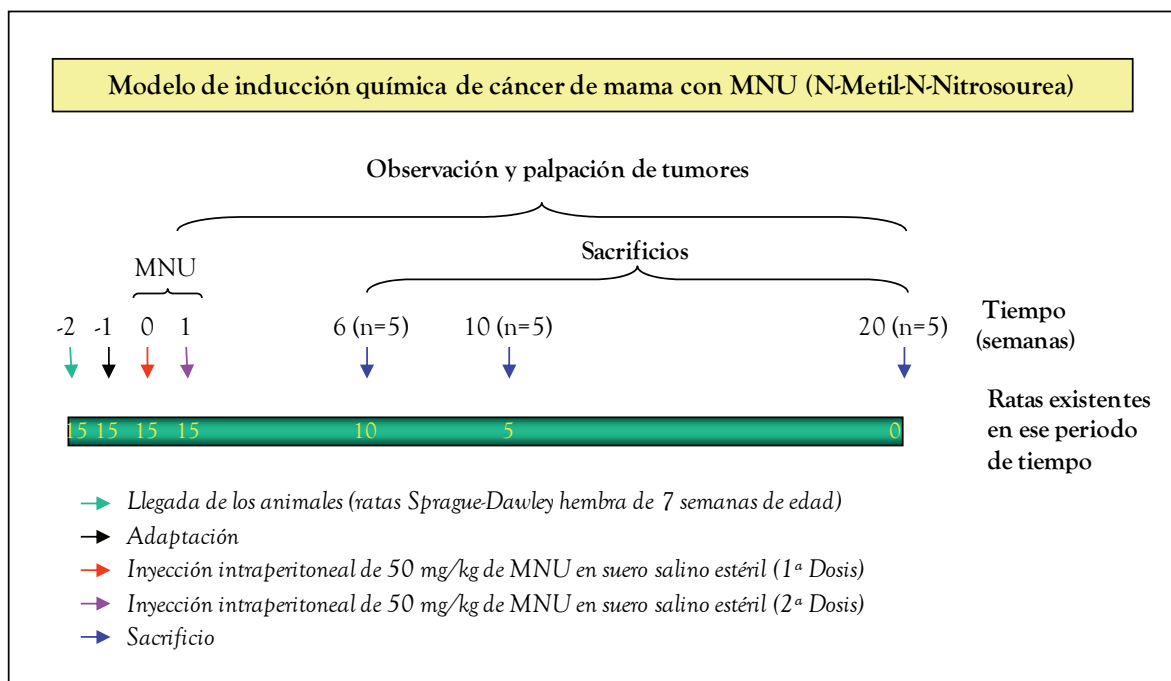


Figura 3. Modelo de MNU para la elección del carcinógeno químico.

Los resultados obtenidos en este experimento preliminar reflejados parcialmente en la tabla 3 (*Tabla 3*) sirvieron para seleccionar el agente cancerígeno a usar en el resto del estudio.

Tabla 3. Volúmenes tumorales totales/rata del estudio de elección del carcinógeno: grupo DMBA

Semana	Rata (n 5)	Nº de tumores	Volumen tumoral total/rata (cm ³)	Volumen tumoral total/semana (cm ³)
11	1	5	5.226	6.822
	2	3	0.481	
	3	5	1.115	
16	1	8	5.986	14.433
	2	5	2.732	
	3	5	4.498	
	4	2	1.124	
	5	2	0.093	
20	1	2	0.249	3.552
	2	4	2.134	
	3	3	0.810	
	4	3	0.359	

Esta tabla demuestra que el momento ideal desde el punto de vista de los tumores coincide con la semana 16 tras la administración del DMBA, donde la incidencia, multiplicidad y volumen tumoral son mayores.

Sin embargo, los resultados obtenidos con MNU fueron muy distintos, ya que en la semana 6 (n=5) solamente 1 rata de las 5 que había que sacrificar mostraba masas tumorales. En cuanto a la multiplicidad, el animal presentaba solamente 1 tumor. El volumen de ese tumor fue de 0.054 cm³. En la semana 10 cuando se cumplieron 9 semanas desde la administración del carcinógeno, sólo había un animal que presentó un único tumor que superó el volumen umbral de 10cm³, con lo cual dicho animal tuvo que ser sacrificado. En la semana 20, sólo 2 ratas pudieron ser sacrificadas con presencia de tumores. Uno de los animales presentaba 2 tumores de volúmenes 0.906 y 2.646 cm³ y el otro sólo presentaba un tumor de volumen 0.233 cm³.

A la luz de estos resultados, la elección del DMBA como carcinógeno más idóneo para la inducción de cáncer de mama en ratas fue evidente. En este modelo, surgen más animales con más tumores, y en menor tiempo, que con la otra sustancia estudiada

(MNU), para las dosis establecidas en este trabajo. Costa y colaboradores (Costa y col., 2002), usando una cantidad diferente de DMBA (5mg) encontraron resultados similares a los nuestros. Estos autores concluyen en su trabajo que además de ser un modelo con alta homogeneidad, reproducibilidad, y bajo tiempo de generación es altamente práctico para el estudio de la carcinogénesis mamaria humana desde un punto de vista histopatológico, convirtiéndose en una herramienta aceptada y adecuada para el entendimiento del cáncer de mama.

II.1.2.- MODELO DE QUIMIOTERAPIA CON ADRIAMICINA E HIDROXITIROSO EN RATAS AFECTAS DE CÁNCER DE MAMA QUÍMICAMENTE INDUCIDO CON DMBA.

Para este estudio se utilizaron 44 ratas Sprague-Dawley hembra (Material y Métodos. Apartado I.3.) distribuidas de forma aleatoria en 5 grupos. Estableciéndose los siguientes:

Grupo 1 (n=10): Control con enfermedad cancerosa sin tratamiento (DMBA).

Grupo 2 (n=10): Hidroxitirosol (HT).

Grupo 3 (n=8): Adriamicina (ADR).

Grupo 4 (n=8): ADR+HT.

Grupo 5 (n=8): Control sano (C).

El motivo por el cual se empleó cada uno de los anteriores grupos fue el siguiente:

Grupo DMBA: control positivo de carcinogénesis mamaria y sin ningún tipo de tratamiento, con el fin de contrastar los resultados obtenidos en los grupos tratados.

Grupo HT: surge para comprobar los efectos antioxidantes, o tóxicos, a las dosis usadas. Constituye otro grupo control del ADR+HT.

Grupo ADR: este grupo se considera control positivo de los efectos adversos generados por la ADR en el tratamiento del cáncer de mama, así como de su efecto antitumoral.

Grupo ADR+HT: su misión es comprobar si los efectos secundarios relacionados con la adriamicina se ven disminuidos de alguna manera por la sustancia natural con elevada capacidad antioxidante (HT). Por otra parte, se desea comprobar si los efectos antitumorales de la ADR se ven reducidos o potenciados por el HT.

Grupo C: control negativo para cáncer de mama químicamente inducido. Este grupo será dedicado siempre a cotejar los resultados surgidos del resto de grupos.

El diseño experimental llevado a cabo se puede estructurar de forma simplificada en dos periodos fundamentales: **PRETRATAMIENTO** y **TRATAMIENTO**. El primero va desde que se administra el DMBA hasta la toma de la biopsia Trucut e inserción del chip, mientras que el segundo se refiere al ciclo de tratamiento con adriamicina y/o hidroxotirosol.

II.1.2.1.- PRETRATAMIENTO: ADMINISTRACIÓN DEL CARCINÓGENO QUÍMICO, DESARROLLO TUMORAL E IMPLANTACIÓN DE MICROCHIPS.

ADMINISTRACIÓN DE DMBA.

Tras la semana de adaptación y cuando los animales contaban con 8 semanas de edad y un peso aproximado de 170 ± 20 g, se inició el modelo químico de cáncer de mama. Para ello, cada rata fue tratada con una única dosis intragástrica mediante *gavage* de **100mg/kg** de DMBA (Huggins y col., 1959; Huggins y col., 1961; Johnson y col., 2003a, 2003b; Todorova y col., 2003, 2004, 2006), usando como vehículo 1ml de aceite de oliva virgen extra (Perumal y col., 2005; Abbadessa y col., 2006; Veena y col., 2006; Arulkumaran y col., 2007). Las ratas pertenecientes al grupo C, recibieron sólo 1ml de aceite de oliva virgen extra siguiendo la misma técnica de inyección intragástrica.

La administración del carcinógeno se llevó a cabo mediante el uso de unas agujas especiales denominadas agujas de “gavage” estériles, de acero y con punta de silicona, con un tamaño de 15Gx3 (Animal Feeding Needles. Popper and Sons, Inc. NY, EEUU). Existen varios tipos de agujas *gavage*: rígidas de acero y desechables con punta de silicona, rígidas de acero autoclavables con punta terminada en bolita de acero, y flexibles de

plástico; las agujas de acero pueden ser a su vez rectas, curvas, o maleables (*Figura 4*). Éstas, penetran fácilmente a través del esófago y hasta el estómago del roedor, asegurando que la sustancia llega a su destino gástrico, como nos muestra la imagen del cuerpo radiografiado de una rata con una aguja de *gavage* introducida, y en la que vemos que dicha aguja llega completamente al estómago (*Figura 5*).

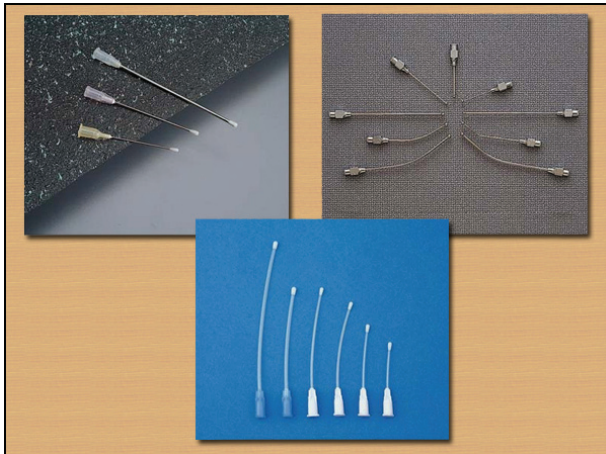


Figura 4. Diferentes tipos de agujas de gavage.



Figura 5. Radiografía tomada a un roedor con una aguja de gavage introducida.

DESARROLLO TUMORAL.

Los experimentos llevados a cabo anteriormente para la elección del carcinógeno químico, han demostrado que se necesitan entre 4 y 5 semanas para la aparición del primer tumor palpable. Por lo tanto, cuando se cumplieron 4 semanas desde la administración del DMBA, se comenzó a palpar 2 veces en semana cada animal, desde la zona del cuello hasta la inguinal, para evaluar la aparición de cualquier masa tumoral, registrando la posición, momento, y volumen de cada una.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño suficiente se midieron con un calibre electrónico digital de pie de rey (Afora, S.A. Barcelona, España). Para la determinación de

los volúmenes tumorales se siguieron dos fórmulas matemáticas diferentes en función de que la morfología del tumor permitiese la toma de dos o tres medidas. Dichas fórmulas son las que siguen:

$$V = 4/3\pi (d_1/2) \times (d_2/2)^2$$

Donde d_1 y d_2 son los dos diámetros del tumor ($d_1 > d_2$) (para aquellos tumores en los que resulta imposible tomar una tercera medida); cuando exista la posibilidad de tomar una tercera medida, la fórmula a usar será la siguiente:

$$V = (d_1/2) \times (d_2/2) \times (d_3/2)$$

Donde d_1 y d_2 son los dos diámetros del tumor y d_3 se corresponde con el grosor ($d_1 > d_2 > d_3$) (Escrich y col., 2004).

Una vez las ratas presentaron al menos un tumor con un volumen de aproximadamente 2 cm^3 fueron incluidas al azar en el calendario de tratamientos.

IMPLANTACIÓN DE MICROCHIP.

Previa anestesia del animal con Ketamina HCl + Clorbutol o Clorobutanol (Imalgene® 1000) a una dosis de **150mg/kg i.p.**, se procedió a la implantación subcutánea de un microchip (MUSICC Chip™ Identification System. AVID® Identification Systems, Inc. CA, EEUU). La inserción se realizó en la zona media dorsal y entre las escápulas del animal usando unas agujas y jeringas especiales (AVID® SUDS Monoject. AVID® Identification Systems, Inc. CA, EEUU), con el fin de tenerlo identificado en todo momento mediante un lector (MINITRACKER II. AVID® Identification Systems, Inc. CA, EEUU).

La inserción del microchip permitió el establecimiento de un modelo secuencial de ingreso de los animales en sus grupos experimentales justo en el momento adecuado desde el punto de vista del tumor, pero sin los problemas derivados de una mala identificación.

Tanto las agujas, como los microchips se desinfectaron previa aplicación y después de la misma con una solución bactericida, fungicida y virucida de uso clínico (LIMOSEPTIC® Concentrado. José Collado, SA. Barcelona, España) (*Figura 6*).

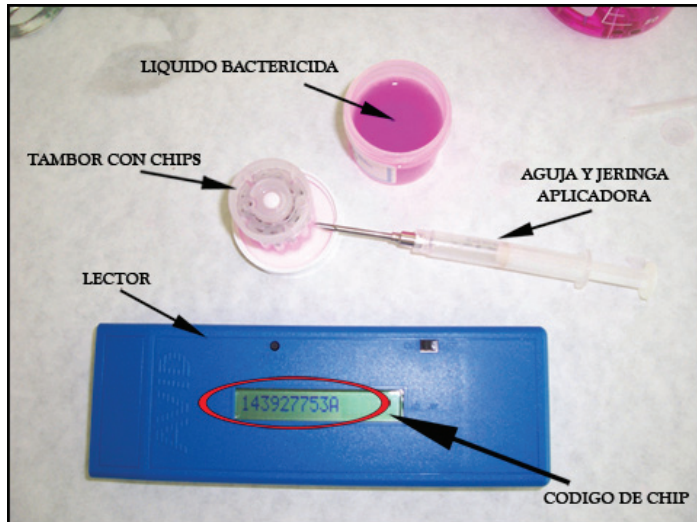


Figura 6. Sistema de implantación y lectura de microchips.

Una vez terminada la implantación, la herida se desinfectó con povidona yodada y fue cerrada la herida usando apósito líquido (Compeed® Liquid Bandage™. Johnson&Johnson, Inc. NJ, EEUU). El uso de este apósito facilitaba el proceso debido a una serie de características:

- 1) Hace las veces de sutura química.
- 2) Facilita la cicatrización rápida, disminuyendo la probabilidad de infecciones.
- 3) Tiene acción calmante.
- 4) Mantiene la herida seca.
- 5) Se desprende por sí mismo a los pocos días de la aplicación

El siguiente paso en la secuencia temporal consistía en la toma de biopsias de tejido tumoral, momento tras el cual el animal está listo para entrar en la fase de tratamiento (si pertenece a un grupo que lo precise).

BIOPSIAS DE TEJIDO TUMORAL.

Lo que se pretende con la realización de la biopsia es tener para cada animal con tumores un control interno de la progresión de las lesiones, pero no se hace en todas las masas que aparecen, sólo en uno de ellos (por motivos prácticos) seleccionado de la forma más aleatoria posible.

Éste será aquel que alcance en primer lugar un volumen de 2cm^3 , usando la fórmula del cálculo de volumen: $V = (d_1/2) \times (d_2/2) \times (d_3/2)$. Si aparecen casualmente dos o más tumores con 2cm^3 de volumen, se toma como tumor preferente para la biopsia aquel que apareció el primero, es decir, el que presentó menor tiempo de latencia. A este tumor se le denomina “Tumor Trucut” y es al que se le hace el seguimiento hasta el momento del sacrificio, así como el estudio de perfil génico mediante microarray.

Acto seguido a la implantación del sistema de microchip, y con el animal aún bajo los efectos de la anestesia, se procedió a la toma de biopsias de tejido tumoral *in vivo* mediante un sistema Trucut Bard® Monopty® Biopsy Instrument de 14g x 10cm de longitud, con una profundidad de penetración de 11mm (*Figura 7*).

Para ello, tras eliminar los pelos con ayuda de unas tijeras curvas y desinfectar la zona con povidona yodada, se realizó una pequeña incisión vertical de unos 2.5 mm de longitud y totalmente superficial (tan sólo se ha de atravesar la capa de piel), introduciendo posteriormente, a través de dicha incisión, el sistema de biopsia Trucut.



Figura 7. Sistema Trucut para toma de biopsias.

Se tomaron dos trozos de tejido de aproximadamente 0.7 cm de longitud y 2.5 mm de diámetro de la misma masa tumoral evitando que la segunda pase por el mismo lugar de la primera. Acto seguido, uno de los cilindros se introdujo en formaldehído 3,94% tamponado a pH 7 (PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España) para su posterior estudio histológico y morfológico. El segundo cilindro fue tratado durante 24h con líquido para preservar el ARN a 4°C (RNA later™, RNA Stabilization Reagent, QIAGEN. Germantown, MD, EEUU), transcurrido este tiempo se eliminó el líquido y se procedió al congelado de las muestras a -80°C hasta el momento de su uso.

Una vez finalizada la pequeña intervención, se desinfectó la zona con povidona yodada, y se cerró la herida usando un líquido cicatrizante (Compeed® Liquid Bandage™. Johnson&Johnson, Inc. NJ, EEUU). El animal biopsiado y con el microchip implantado se recuperó durante los dos días siguientes en una jaula individual, alejada de otros individuos que pudieran atacar la herida. Durante esos dos días, las heridas se limpiaron y desinfectaron hasta cuatro veces al día. Si una vez desprendido el apósito la herida continuaba abierta se volvía a desinfectar la zona y se aplicaba de nuevo el apósito líquido, manteniendo al roedor otros dos días en aislamiento.

II.1.2.2.- TRATAMIENTO: TRATAMIENTO CON ADRIAMICINA Y/O HIDROXITIRO SOL.

Obtenida la biopsia de los animales y tras el periodo de recuperación, estas fueron sometidas al tratamiento con ADR y/o HT.

ADRIAMICINA (*Grupo ADR*).

El agente antineoplásico aplicado a nuestro estudio ha sido la Adriamicina o Doxorubicina, por tratarse de uno de los fármacos más eficaces para el tratamiento del cáncer de mama (Sausville y Longo, 2006).

Con el fin de asemejar lo máximo posible nuestro estudio a la administración real de quimioterapia que se da a las mujeres afectas de carcinogénesis mamaria, se siguió el protocolo clínico de dosis para este citostático. En concreto, se utilizó una dosis de **1mg/kg** de ADR (Farmiblastina[®] Pharmacia. Solución inyectable, 50mg/25ml) por vía intravenosa, que a pesar de la dificultad, y tras discutir las diferentes posibilidades (vena ilíaca, de la cola, yugular, etc.), se haría a través de la vena lateral de la cola (Lui y col., 2002; Ueno y col., 2006; Xiang y col., 2008).

A la luz de los hallazgos bibliográficos, se diseñó un protocolo basado en la administración de una dosis de 1mg/kg de doxorubicina durante 7 semanas (Dosis Acumulada (DA): 7mg/kg) (Della Torre y col., 1999a, 1999b). En un experimento previo al comienzo del estudio que se expone en la presente memoria de tesis, se concluyó que dicho protocolo no sólo es efectivo sino que en la sexta semana el volumen de los tumores disminuía de forma sustancial.

Lo disentido en el párrafo anterior hizo modificar el calendario de tratamiento antitumoral, quedando resumido de la siguiente manera: **Administración de 1mg/kg/semana durante 6 semanas de Adriamicina a través de la vena lateral de la cola (DA: 6mg/kg)**. Alcanzada la semana 7 o bien cuando algún tumor hubo alcanzado el volumen máximo de 10cm³ (por motivos éticos) se procedió al sacrificio de los animales mediante exanguinación, siguiendo el protocolo del comité ético de la Universidad de

Granada para ensayos en animales de experimentación previa anestesia con Ketamina HCl + Clorbutol o Clorobutanol a una dosis de 150mg/kg i.p. (Figura 8).

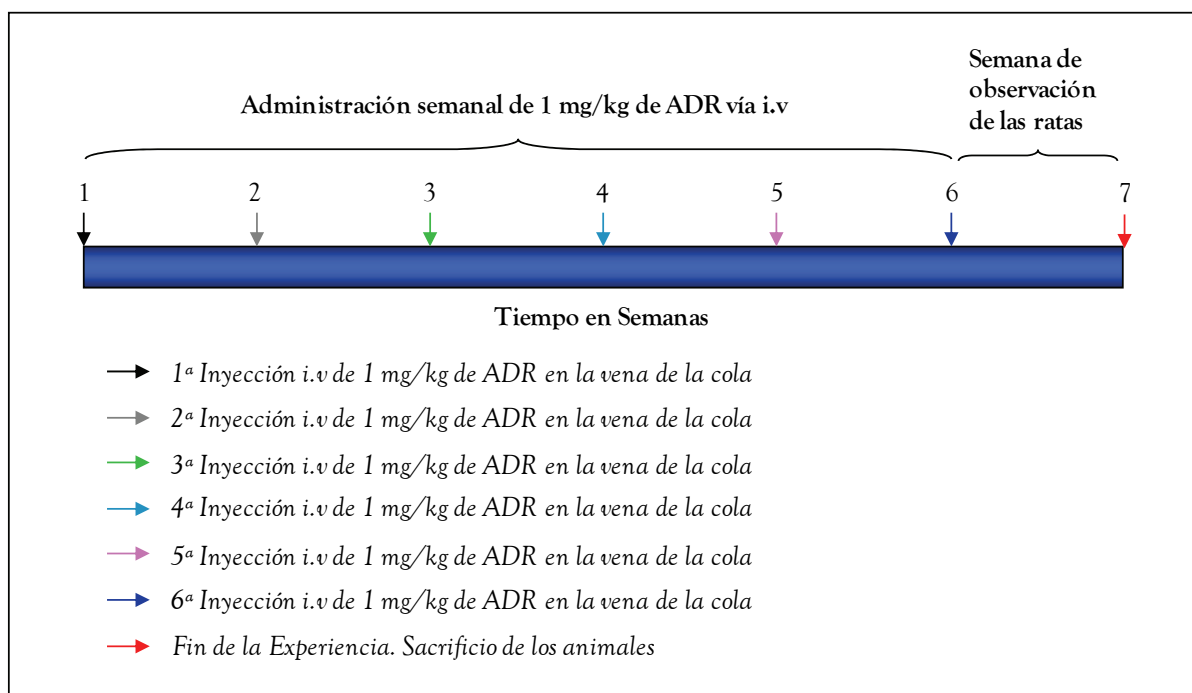


Figura 8. Esquema simplificado del tratamiento con adriamicina.

HIDROXITIRO SOL (Grupo HT).

Las ratas pertenecientes a este grupo de tratamiento recibieron por vía intragástrica mediante *gavage* cinco dosis semanales de HT de 0.5mg/kg/día (3,4-Dihydroxyphenyl Ethanol 50mg supplied in 1ml ethanol. CAYMAN CHEMICAL COMPANY) (Figura 9), durante 6 semanas en solución acuosa.

Al no existir en la literatura trabajos con HT y ratas se administró una dosis de HT cinco veces superior a la ingesta estimada de un consumidor medio de 70 kg de peso corporal a través del aceite de oliva virgen.

Una vez terminado el calendario de tratamiento y pasado la semana 7 o bien cuando algún tumor alcanzara el volumen máximo de 10cm³ (por motivos éticos) se procedió al sacrificio de los animales mediante exanguinación, siguiendo el protocolo del comité

ético de la Universidad de Granada para ensayos en animales de experimentación previa anestesia con Ketamina HCl + Clorbutol o Clorobutanol a una dosis de 150 mg/kg i.p.

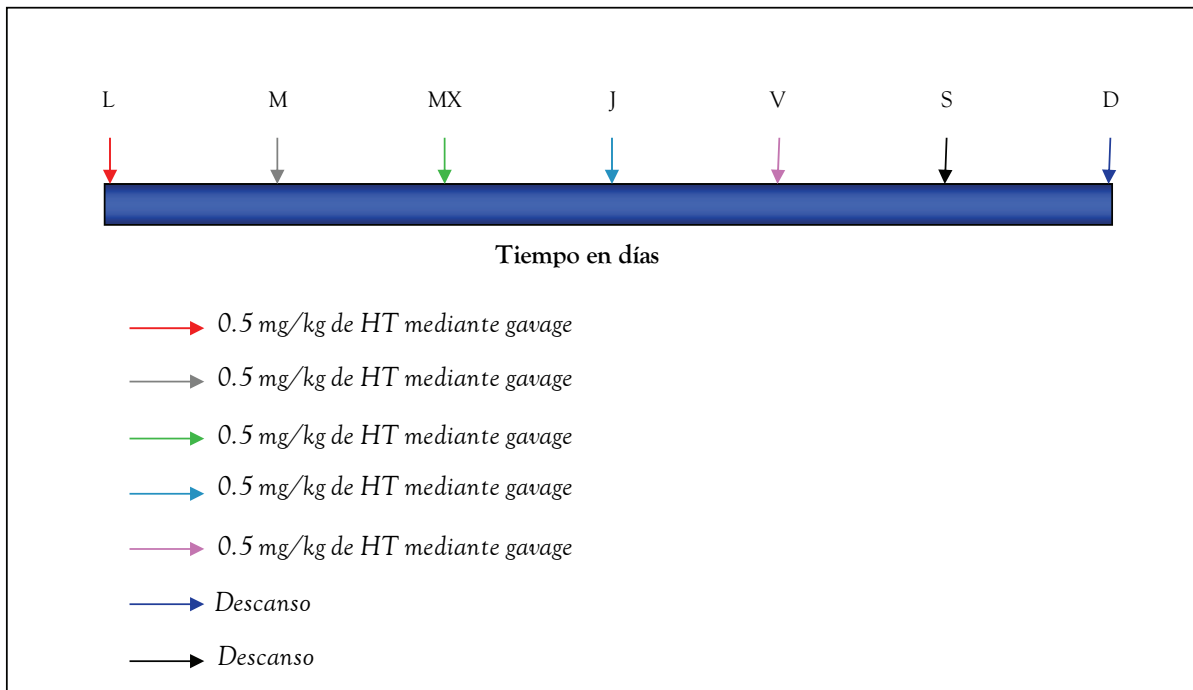


Figura 9. Esquema simplificado del tratamiento semanal con hidroxitirosol.

Los animales correspondientes al grupo DMBA siguieron el mismo protocolo llevado a cabo para los grupos ADR y HT, la única diferencia es que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento.

II.1.2.3.- SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS VOLÚMENES TUMORALES.

Implantado el microchip y biopsiado el tumor se hizo un seguimiento exhaustivo de la evolución del volumen de todos los tumores. Para ello, se midieron dos veces en semana usando un calibre electrónico y calculando dicho volumen mediante la fórmula vista en el Apartado II.1.2.1. de esta sección (Desarrollo Tumoral): $V = (d_1/2) \times (d_2/2) \times (d_3/2)$.

II.1.2.4.- PARÁMETROS TUMORALES DETERMINADOS EN CADA ANIMAL.

- *Multiplicidad al Inicio (Basal)*: Número total de tumores que se desarrollan en la rata desde que se suministra el carcinógeno hasta que al menos un tumor mide unos 2cm³.
- *Multiplicidad al Sacrificio (Final)*: Número total de tumores que se desarrollan en la rata desde que al menos un tumor mide unos 2cm³ hasta el sacrificio.
- *Volumen del tumor de la biopsia o trucut al inicio del estudio (Basal)*.
- *Volumen del tumor trucut al momento del sacrificio (Final)*.
- *Volumen tumoral total*.

II.2.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

II.2.1.- TUMORES MAMARIOS.

En este paso se extirpan todos y cada uno de las tumoraciones que presenta el animal, incluyendo la del Trucut.

“TUMOR TRUCUT”.

Anestesiado el animal se procedió a la extirpación del tumor trucut (*Figura 10*), la mitad del cual se incluyó en formaldehído 3,94% tamponado a pH 7 para su posterior estudio anatomopatológico. Una pequeña porción fue introducida en RNA Later™ durante 24 horas a 4°C, que tras eliminar el líquido fue congelada a -80°C. El resto se protegió del ambiente externo con una envoltura de papel de aluminio y se introdujo en nitrógeno líquido para luego ser almacenado a -80°C hasta el momento de su análisis.



Figura 10. Fotografía tomada a un tumor mamario durante el sacrificio. Aparece el código del animal abajo a la derecha.

RESTO DE TUMORACIONES.

Los restantes tumores extirpados fueron pesados, medidos, incluidos al completo en formaldehído 3,9-4% tamponado a pH 7 y enviados al especialista en anatomía patológica (*Figura 11*). Aquellos tumores de muy pequeño tamaño que aparecieron durante la extirpación y que pasaron inadvertidas durante el seguimiento no se estudiaron desde el punto de vista anatomopatológico, sólo fueron incluidos en los datos de multiplicidad y volumen tumoral total.

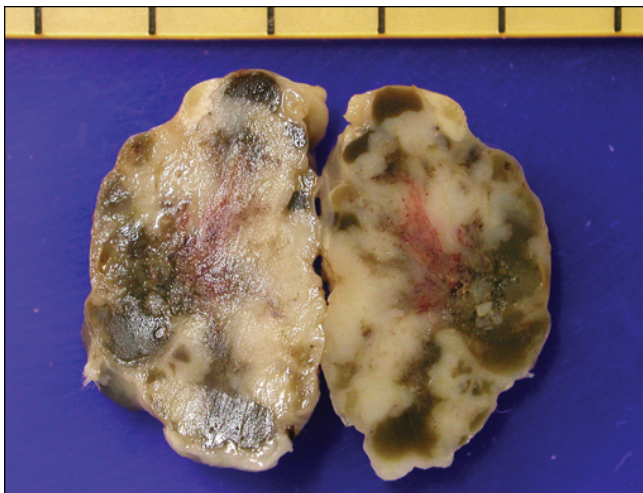


Figura 11. Corte del tumor de la figura 10 tras su fijación en formaldehído.

II.2.2.- SANGRE Y PLASMA.

SANGRE.

La recolección de la sangre del animal se obtuvo mediante la canulación de la arteria aorta abdominal y siguiendo el protocolo del comité ético de la Universidad de Granada para ensayos en animales de experimentación. Previa anestesia, se coloca el animal en posición decúbito supino y tras laparotomía media [*Figura 12. 1*] se localiza la aorta abdominal, hasta la bifurcación en las arterias ilíacas [*Figura 12. 2*]. Con extremo cuidado se procede a la separación de la aorta y la vena cava usando un utensilio curvo y romo que no desgarre a ninguno de estos vasos y se pasa un hilo por el extremo inferior del vaso y se anuda próximo a las arterias ilíacas [*Figura 12. 3*]. Se introduce un segundo hilo a cierta distancia del primero (sin anudar por el momento), con objeto de dejar suficiente espacio para introducir la cánula posteriormente [*Figura 12. 4*]. Se interrumpe la circulación a través de la aorta con la ayuda de una pinza atraumática bulldog DeBakey, colocándolo por encima del segundo hilo, aún sin anudar [*Figura 12. 5*] y a continuación se efectúa una pequeña incisión en el vaso, por debajo de la pinza, evitando la sección completa de la arteria [*Figura 12. 6*]. Se introduce la cánula (previamente tratada con anticoagulante) en la aorta a través de la incisión realizada con anterioridad [*Figura 12. 7*], intentando introducirla al máximo, para evitar su expulsión tras el restablecimiento de la circulación y se anuda el extremo de la cánula introducido en el vaso, usando el hilo que quedaba sin anudar próximo a la pinza [*Figura 12. 8*]. Por último, se retira la pinza cuidadosamente [*Figura 12. 9*] con el fin de restablecer la circulación y se procede a la recolección de la sangre en tubos previamente tratados con EDTA Na₂ (BD Vacutainer™. K3E 15%, 0.12ml. BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions. Plymouth, Reino Unido).

Inconvenientes asociados: Esta técnica acoplada a la extirpación previa de los tumores presenta ciertos obstáculos relacionados con la disminución drástica de la temperatura del animal durante la intervención (que puede prolongarse durante unos 10 minutos), y con la pérdida de sangre como consecuencia de la extracción de las masas mamarias anormales. Todo esto hace que en muchas ocasiones el animal no resista el tiempo suficiente como para dar un volumen sanguíneo adecuado, lo cual puede

condicionar la realización de un número menor de determinaciones analíticas posteriores en sangre.

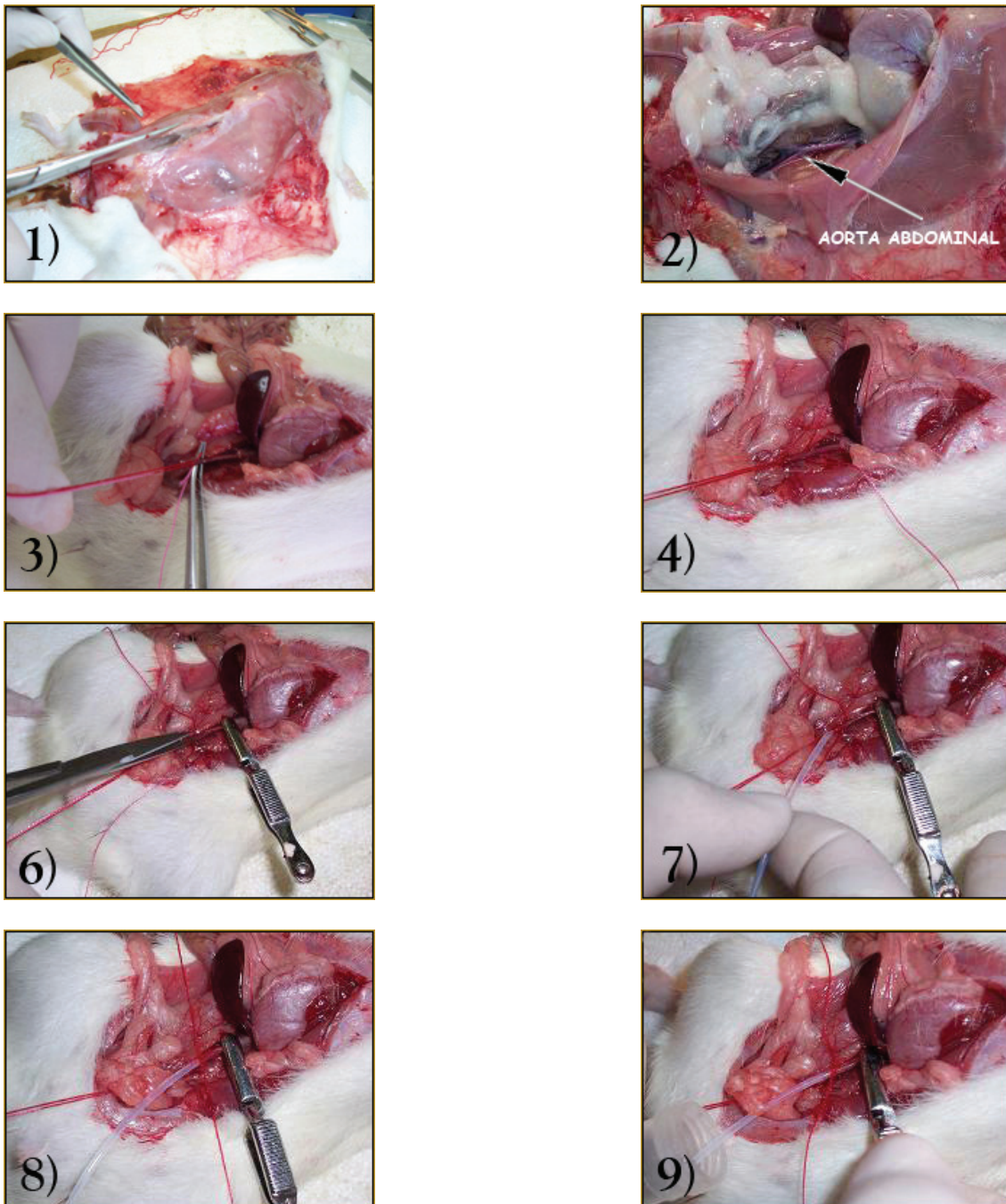


Figura 12. Secuencia de imágenes de la canulación de la arteria aorta abdominal.

PLASMA.

Cuando se hubo tomado la cantidad de sangre necesaria para realizar el ensayo de genotoxicidad "Comet", el resto se centrifugó a 700xg durante 15 minutos y a una temperatura de 4°C, usando una centrifuga refrigerada de mesa (BECKMAN GS-6R). Acabada la centrifugación se recogió el plasma y se alicuotó en tubos de congelación de 2ml estériles con tapón de rosca (Micro tube 2ml, PP. SARSTEDT. Aktlengesellschaft & Co. Alemania).

Por norma general, se tomaron alícuotas de 500µl, usando tantos tubos como fuese necesario, sin embargo, como ya se ha comentado en la recogida de la sangre hubo varios animales que no dieron suficiente muestra como para recolectar un volumen abundante de plasma, hecho que ha condicionado la realización de ciertas determinaciones posteriores.

II.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS.

II.3.1.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS.

Todas las determinaciones bioquímicas realizadas en las muestras de plasma, se llevaron a cabo mediante kits comerciales SPINREACT (SPINREACT, S.A., Girona, España); adaptados para la aplicación de un lector de microplacas SYNERGY HT, *Multi-Detection Microplate Reader*, (BIO-TEK® Instruments Inc. Vermont, EEUU), utilizando microplacas estándares de 96 pocillos (*Figura 13*). Tanto las muestras, como los patrones y blancos, se prepararon por duplicado.

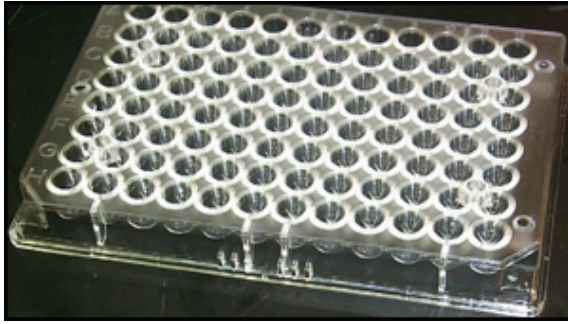


Figura 13. Microplaca estándar de 96 pocillos.

II.3.1.1.- GLUCOSA.

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.



MÉTODO.

Se añadieron 5 μ l de plasma en cada pocillo de una microplaca, y se mezclaron con 100 μ l de reactivo (Tris 92 mM, Fenol 0.3 mM, GOD 15000 U/L, POD 1000 U/L y 4-Aminofenazona 2.6 mM); el mismo proceso se siguió con el patrón primario acuoso (Glucosa 100mg/dl). A continuación, se agitó y se incubó durante 10 minutos a 37°C, tras el cual se leyó la absorbancia o densidad óptica (DO) del patrón y de la muestra frente al blanco a 505 nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Una vez restado el valor de DO del blanco al patrón y a la muestra (DO corregida, DOc), se siguió la siguiente fórmula: $(DOc \text{ Muestra}/DOc \text{ Patrón}) \times 100$, dando como

resultado el valor de glucosa plasmática expresado en mg/dl. (Para obtener mmol/L, fue aplicado el factor de corrección: mg/dl x 0.0555).

II.3.1.2.- PROTEÍNAS TOTALES.

En medio alcalino, las proteínas dan un intenso color violeta azulado en presencia de sales de cobre. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína total presente en la muestra.

MÉTODO.

Para esta determinación, se pipeteó 5µl de muestra en cada uno de los pocillos de la placa, acto seguido se adicionaron 200µl de reactivo Biuret (Potasio sodio tartrato 15 mM, Yoduro sódico 100 mM, Yoduro de potasio 5 mM y Sulfato de cobre (II) 5 mM); del mismo modo se procedió con el patrón primario de albúmina bovina (7 g/dl). La mezcla obtenida fue agitada vigorosamente y se incubó durante 5 minutos a una temperatura de 37°C, transcurrido éste, se procedió a la lectura de DO del patrón y la muestra frente al blanco (Biuret) a una longitud de onda de 540 nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Para hallar la concentración de proteínas (expresada como g/dl) en la muestra de plasma se aplicó la fórmula: (DOc Muestra/DOc Patrón) x 7.

II.3.1.3.- LÍPIDOS TOTALES.

Los lípidos insaturados reaccionan con el ácido sulfúrico en caliente con la formación de iones carbonio. En una segunda etapa, éstos, en presencia de fosfovainillina dan una coloración rosada. La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de lípidos totales presente en la muestra problema.

MÉTODO.

El desarrollo del método consistió en dispensar 5µl de cada muestra en sus correspondientes tubos de congelación de 2ml; en el caso del patrón primario acuoso

(750mg/dl de Lípidos totales) el procedimiento fue el mismo. A continuación se añadieron 125µl de ácido sulfúrico (Ácido Sulfúrico 98%, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España), y se agitó vigorosamente en vortex. Tras la agitación, se incubaron, tanto las muestras y el patrón, como el blanco (ácido sulfúrico) en un baño seco (LABNET INTERNATIONAL, Inc. Woodbridge, NJ, EEUU) a 100°C durante 10 minutos. Luego se enfriaron en un baño y se dispensaron 5µl del hidrolizado en una microplaca (muestra, patrón y blanco), y se adicionaron 100µl de Fosfovainillina 235 mM. Tras una enérgica agitación, se incubó durante 15 minutos a 37°C y se procedió a la lectura de la DO del calibrador y la muestra frente al blanco.

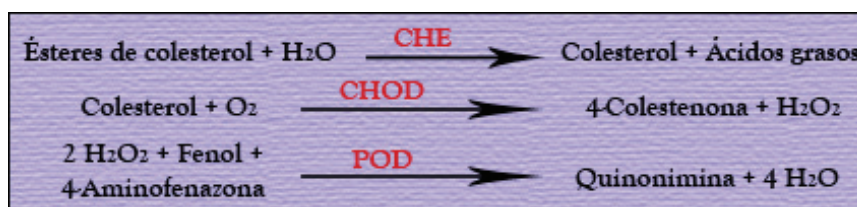
CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

(DOc Muestra/DOc Patrón) x 750; resultando la concentración de lípidos totales en la muestra, expresada como mg/dl.

Hubo ciertas muestras que presentaban unos niveles de lípidos tan elevados, que se superó el límite de linealidad del método; por esta razón, fue necesario partir de la mitad de muestra de plasma (2.5µl).

II.3.1.4.- COLESTEROL.

El colesterol presente en la muestra problema origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



(CHE: Colesterol esterasa; CHOD: Colesterol oxidasa; POD: Peroxidasa)

La intensidad del color que se forma es proporcional a la concentración de colesterol que tenemos en el plasma a evaluar.

MÉTODO.

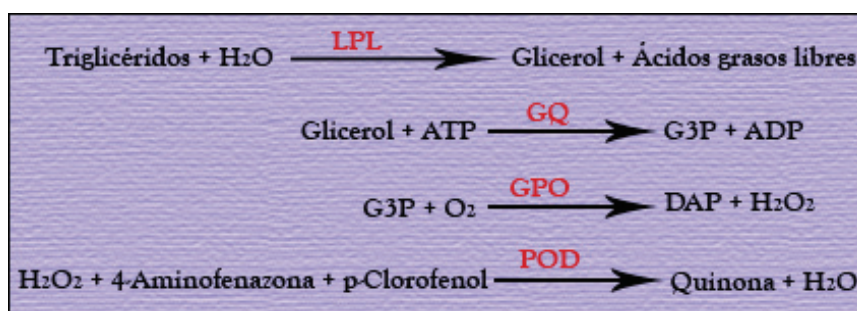
Se aplicaron 5µl de plasma en el pocillo correspondiente, al igual que el patrón primario acuoso de colesterol (200mg/dl), se añadieron 100µl de reactivo (Colesterol esterasa 300 U/L, Colesterol oxidasa 300 U/L, Peroxidasa 1250 U/L, 4-Aminofenazona 0.4 mM, Fenol 26 mM y PIPES 90 mM pH 6.9) tanto a muestras como patrón y blanco (reactivo), la mezcla se agitó incubó a 37°C durante 5 minutos; acto seguido, se leyó la absorbancia del patrón y la muestra frente al blanco a 505nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Fórmula empleada: (DOc Muestra/DOc Patrón) x 200. Obteniendo la concentración de colesterol plasmático expresada como mg/dl. (Para obtener mmol/L se aplicó el factor de corrección: mg/dl x 0.0258).

II.3.1.5.- TRIGLICÉRIDOS.

Los triglicéridos incubados con lipoprotein lipasa (LPO), liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerol-3-oxidasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GQ), para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P se convierte en dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno por la GPO. Al final, el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-Aminofenazona y p-Clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja.



La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

MÉTODO.

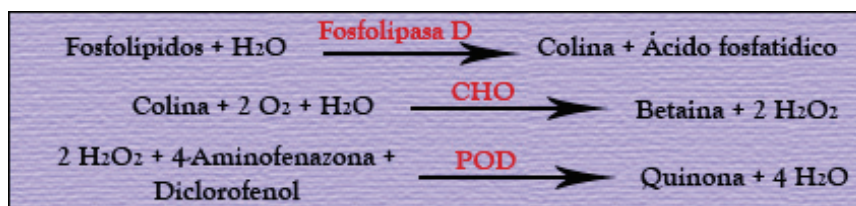
Se pipetearon en la placa 5µl de cada muestra, 5µl de patrón primario acuoso de triglicéridos (200mg/dl), junto con 100µl de reactivo (GOOD pH 7.5 50 mM, p-Clorofenol 2 mM, Lipoproteín lipasa 150000 U/L, Glicerol quinasa 500 U/L, Glicerol-3-oxidasa 2500 U/L, Peroxidasa 440 U/L, 4-Aminofenazona 0.1 mM y ATP 0.1 mM) y 100µl de blanco (reactivo). Se agitó la microplaca y se incubó durante 10 minutos a una temperatura de 37°C, transcurrida la cual, se procedió a la lectura de DO del patrón y la muestra frente al blanco.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Con el fin de conocer la concentración (mg/dl) de triglicéridos de nuestra muestra, se aplicó la fórmula que sigue: (DOc Muestra/DOc Patrón) x 200. (Para obtener mmol/L se aplicó el factor de corrección: mg/dl x 0.0113).

II.3.1.6.- FOSFOLÍPIDOS.

Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa D y la colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa (CHO) a betaína, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido de hidrógeno acopla oxidativamente a la 4-Aminofenazona y al diclorofenol, formando una quinonamina coloreada.



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fosfolípidos de la muestra ensayada.

MÉTODO.

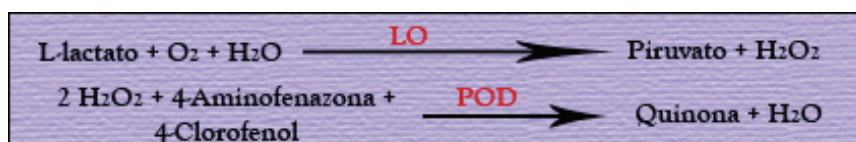
Se pipetearon 5µl de muestra y de patrón primario acuoso de fosfolípidos (300mg/dl) en la microplaca, se mezcló con 100µl de reactivo (Fosfolipasa D 400 U/L, Colina oxidasa 2200 U/L, Peroxidasa 3600 U/L, 4-Aminofenazona 1 mM, Diclorofenol 2.1 mM y TRIS 50 mM pH 7.55), y tras la agitación correspondiente se incubó a 37°C, 5 minutos. Lectura a una absorbancia de 505nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Concentración fosfolipídica (mg/dl): (DOc Muestra/DOc Patrón) x 300. (Para obtener mmol/L se aplicó el factor de corrección: mg/dl x 0.0129).

II.3.1.7.- LACTATO.

El lactato es oxidado por la lactato oxidasa (LO) a piruvato y peróxido de hidrógeno, éste en presencia de peroxidasa (POD), 4-Aminofenazona y 4-Clorofenol forma un compuesto rojo de quinona, cuya intensidad será proporcional a la concentración de lactato en la muestra.

**MÉTODO.**

Se añadieron 2.5µl tanto de muestra como de patrón (patrón acuoso de lactato 10mg/dl) a la placa, y se mezcló con 100µl de reactivo (PIPES 50 mM pH 7.5, 4-Clorofenol, Lactato oxidasa 800 U/L, Peroxidasa 2000 U/L y 4-Aminofenazona 0.4 mM). Tras agitación e incubación a 37°C, 5 minutos, se leyó la absorbancia del patrón y la muestra frente al blanco (reactivo) a 505nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Concentración plasmática de lactato: (DOc Muestra/DOc Patrón) x 10. (Para obtener mmol/L se aplicó el factor de corrección: mg/dl x 0.111).

II.3.1.8.- FOSFATASA ALCALINA.

La fosfatasa alcalina (ALP) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato a pH 10.4, liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-nitrofenol, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra problema.

MÉTODO.

Se pipetearon 5µl de muestra en el pocillo correspondiente, y se mezcló con 120µl de reactivo (Dietanolamina 1 mM pH 10.4, Cloruro de magnesio 0.5 mM y p-Nitrofenilfosfato 10 mM). Tras la agitación de la placa y un minuto de incubación a 37°C, se procedió a la lectura de DO al inicio y cada minuto durante 3 minutos (37°C) a 405nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Se calculó el promedio de incremento de absorbancia por minuto ($\Delta\text{DO}/\text{min}$), y el resultado se multiplicó por 3300, obteniendo U/L de ALP en la muestra.

II.3.1.9.- LACTATO DESHIDROGENASA.

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato por el NADH, según la siguiente reacción:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH es proporcional a la concentración catalítica de LDH en la muestra ensayada.

MÉTODO.

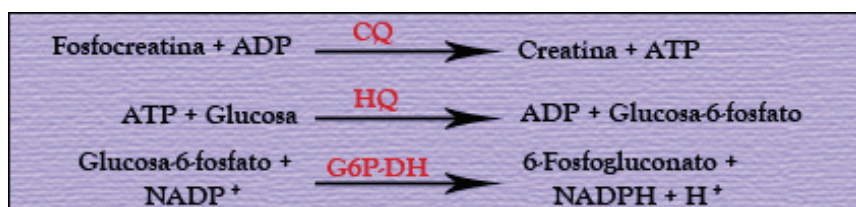
Se pipetearon en una microplaca 2.5µl de plasma y 150µl de reactivo (Fosfato 50 mM pH 7.8, Piruvato 0.6 mM y NADH 0.18 mM). Todo se agitó e incubó durante un minuto a 37°C, transcurrido el cual se procedió a la lectura de la DO (340nm) de la muestra al inicio y cada minuto durante 3 minutos y a una temperatura constante de 37°C.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Se calculó el promedio de incremento de absorbancia por minuto: $\Delta DO/\text{min}$; el resultado fue multiplicado por 9690, resultando U/L de LDH de la muestra.

II.3.1.10.- CREATINA QUINASA.

La creatina quinasa (CQ) cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP. Esta reacción se acopla con otras catalizadas por la hexoquinasa (HQ) y por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH). La velocidad de formación de NADPH es proporcional a la concentración catalítica de CQ en la muestra problema.

**MÉTODO.**

Se añadieron a la placa 5µl de plasma junto con 100µl de reactivo (Imidazol 100 mM pH 7, Glucosa 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, EDTA 2 mM, ADP 2 mM, AMP 5 mM, di-Adenosina-5.pentafosfato 10 mM, NADPH⁺ 2 mM, Hexoquinasa 2500 U/L, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1500 U/L, N-acetilcisteína 20 mM y Fosfato de creatina 30 mM). Tras la correspondiente agitación, se incubó a 37°C durante 2 minutos, y se leyó la absorbancia de la muestra al inicio y cada minuto durante 3 minutos (temperatura de la lectura de 37°C) a una longitud de onda de 340nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

El promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta DO/\text{min}$) fue calculado; el resultado se multiplicó por 8095, resultando las U/L de Creatina Quinasa plasmática.

II.3.1.11.- ALANINA AMINOTRANSFERASA GPT (ALT).

La alanina aminotransferasa (ALT), inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADPH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra.



MÉTODO.

Se pipetearon 10 μ l de muestra junto con 100 μ l de reactivo (TRIS 100 mM pH 7.8, L-Alanina 500 mM, NADH 0.18 mM, Lactato deshidrogenasa 1200 U/L y α -Cetoglutarato 15 mM); la mezcla se agitó e incubó (37°C) durante 1 minuto, transcurrido el cual se leyó la DO (340nm) de la muestra al inicio y cada minuto durante 3 minutos (37°C).

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

El promedio de $\Delta DO/\text{min}$ fue calculado y multiplicado por 1750, resultando las U/L de ALT de la muestra.

II.3.1.12.- ASPARTATO AMINOTRANSFERASA GOT (AST).

La aspartato aminotransferasa (AST), inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es

reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra problema.



MÉTODO.

Se añadieron a la placa 10 μ l de muestra y 100 μ l de reactivo (TRIS 80 mM pH7.8, L-Aspartato 200 mM, NADH 0.18 mM, Lactato deshidrogenasa 800 U/L, Malato deshidrogenasa 600 U/L y α -Cetoglutarato 12 mM). Acto seguido se agitó e incubó durante 1 minuto (37°C), y luego se procedió a la lectura de la absorbancia (340nm) inicial de la muestra y cada minuto durante 3 minutos.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Se calculó la Δ DO/min, y el resultado fue multiplicado por 1750; resultando las U/L de AST de la muestra.

II.3.2.- PARÁMETROS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.

II.3.2.1.- CUANTIFICACIÓN DE RETINOL, TOCOFEROL Y COENZIMAS Q₁₀ Y Q₉ MEDIANTE HPLC.

REACTIVOS.

- 1-propanol (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Ácido perclórico 70% (PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España)
- Coenzimas Q₉ y Q₁₀ (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Etanol ultrapuro HPLC (Ethanol, gradient grade for liquid chromatography. LiChrosolv®. MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Perclorato de litio 20mM (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Retinol (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

- α -tocoferol (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

MÉTODO.

El coenzima Q fue analizado mediante HPLC acoplado a un detector electroquímico coulométrico (HPLC-EQ) siguiendo el método de Battino y colaboradores (Battino y col., 2004). El sistema HPLC estaba compuesto por una bomba Beckman System Gold 125 (Beckman Instruments. Fullerton, CA, EEUU), un sistema automático de inyección de muestras Water 717 plus (Milford, MA, EEUU), una columna de acero inoxidable de 15cm de longitud y 4.6mm de diámetro interno relleno de una fase estacionaria ODS Supercosil de 3 μ m, un detector electroquímico ESA Coulochem III (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU), una célula guarda modelo 5020 y una célula analítica modelo 5011 (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU). La determinación se realizó manteniendo la columna a una temperatura constante de 22°C mediante el uso de un horno Peltier JetStream Plus (Thermotechnic Products GMBH .Langenzersdorf, Austria). Los cromatogramas fueron integrados usando el sistema System Gold Beckman (Beckman Instruments. Fullerton, CA, EEUU). La fase móvil consistía en una disolución de perclorato de litio 20mM, ácido perclórico 10mM, etanol al 20%, metanol al 80%, cuyo flujo era de 1ml/min; el electrodo 1 fue ajustado a -0.5V, mientras que el electrodo 2 lo estaba a +0.35V. De forma paralela, en la misma inyección y separación cromatográfica que para el coenzima Q, se analizaron retinol y α -tocoferol usando el mismo sistema de HPLC acoplado a un sistema de detección de diodo array (Beckman Diode array 168 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU). El retinol se detectó a 325nm y el tocoferol a 292nm. La extracción se realizó a partir de 100 μ l de plasma diluido en 300 μ l de 1-propanol. Tras la agitación vigorosa con vortex durante 60 segundos, se procedió a la centrifugación a 17870xg durante 5 minutos. Para la determinación cromatográfica se inyectaron 30 μ l de sobrenadante. El coenzima Q, retinol y tocoferol fueron identificados determinando los tiempos de retención de los estándares individuales y realizando una curva patrón.

II.3.2.2.- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DEL PLASMA (Adaptado a lector de microplacas).

Para la determinación de la capacidad antioxidante total plasmática (TAC) se utilizó el método descrito por Re y colaboradores (Re y col., 1999). Se basa en la decoloración del catión radicalario ABTS^{•+} (formado a partir de ABTS) llevados a cabo por los compuestos antioxidantes del plasma.



REACTIVOS.

1) Solución madre de ABTS.

- ABTS 7 mM (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt. BioChemika, purum, $\geq 99.0\%$ (HPLC); Fluka)
- Persulfato potásico 140 mM (Potassium persulphate, max. 0.001% N, GR. MERCK. E.Merck, Darmstadt, Alemania).

La solución madre de radical ABTS^{•+} se preparó mezclando una solución acuosa de ABTS 7 mM, con 88 μ l de persulfato potásico 140 mM (concentración final 2.45 mM), y con incubación en oscuridad y temperatura ambiente durante 16 horas con una ligera agitación continua. El ABTS y el persulfato potásico reaccionan estequiométricamente en una proporción 1:0.5, resultando en una oxidación incompleta del ABTS, generándose el catión radicalario ABTS^{•+} de color verde azulado y que presenta un máximo de absorción a 734nm.

2) Solución de trabajo de ABTS^{•+}.

Antes de la realización del ensayo, la disolución madre preparada anteriormente se diluye con PBS 1X (PBS 10X pH7.4 GIBCO[®] INVITROGEN[™], CaCl₂-MgCl₂ free, EEUU), con el fin de ajustar la DO a 0.70 \pm 0.02 (734nm).

3) Estándares de TROLOX en solución etanólica.

- TROLOX 1 mM ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid. Purum, ≥ 98.0% (HPLC); Fluka).
- Etanol ultrapuro HPLC (Ethanol, gradient grade for liquid chromatography. LiChrosolv®. MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para la posterior confección de una curva estándar, se prepararon los siguientes estándares de TROLOX en solución etanólica: 0, 125, 250, 500, 750 y 1000 μM , a partir del estándar concentrado de TROLOX 1 mM.

MÉTODO.

La determinación de TAC se llevó a cabo por duplicado, diluyendo la muestra de plasma en proporción 1:10 con PBS 1X (pH 7.4). A continuación, se pipetearon 4 μl de plasma diluido y de cada uno de los estándares arriba mencionados, y se mezclaron con 196 μl de solución de trabajo de ABTS^{•+}. La curva estándar resultante estaba formada por los siguientes puntos: 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20 μM . La mezcla se agitó por espacio de 1 minuto con ayuda de un agitador de placas. A continuación, se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 minutos. Pasado este tiempo la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 734nm.

CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Para la cuantificación de TAC de las muestras plasmáticas, se extrapolaron las DO en la función de calibración obtenida con los patrones, usando para ello el software Slide Write® Plus para Windows y multiplicando los resultados por el factor de dilución. El resultado final vendrá expresado como $\mu\text{mol/l}$ de Trolox.

II.3.2.3.- VALORACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA: ENSAYO COMET ALCALINO.

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales (single-cell gel electrophoresis assay) o “Ensayo Comet” es un método simple, rápido y sencillo para medir daño en el ADN de células eucariotas (animales y vegetales) individuales, así como

en pequeñas muestras de tejido (Duthie, 2003). Ha sido un método estándar para evaluar el daño a nivel de ADN en la pasada década, con aplicaciones en epidemiología molecular y biomonitorización humana, comprobación de genotoxicidad, ecogenotoxicología, así como en la investigación básica de daño y reparación del ADN (Collins, 2004).

Se trata de un método adaptado de la técnica de electroforesis en microgel de Östling y Johanson (Östling y Johanson, 1984) quienes observaron que, el ADN de células de linfoma de ratones previamente irradiadas con radiación gamma, suspendidas en gel de agarosa en un portaobjetos, lisadas con un detergente neutro y expuesto a un campo eléctrico débil, migró más hacia el ánodo que el ADN de aquellas células no irradiadas. Estos autores propusieron que la radiación produce roturas en la cadena de ADN, permitiendo la relajación del ADN superenrollado y dando lugar a una migración más pronunciada de éste en el gel, obteniendo como resultado una imagen muy particular, semejante a un cometa.

Las variantes más comunes de ensayo comet son: alcalino, neutro, y uso de enzimas lesión-específicas. La modalidad alcalina es el resultado de la modificación llevada a cabo por Singh y colaboradores (Singh y col., 1988), quienes optimizaron la desnaturalización alcalina del ADN y las condiciones de electroforesis, permitiendo la evaluación del daño de una de las cadenas de ADN y de los lugares sensibles a medio alcalino. Actualmente se usa el protocolo introducido por Singh pero simplificado (Duthie, 2003; Collins, 2004).

Otras variantes menos comunes son: marcaje con bromodeoxiuridina para detectar ADN replicante, detección de intermediarios en la reparación de ADN, comets FISH (*Fluoresce In Situ Hybridation*) (Collins, 2004).

Ensayo Comet Alcalino.

La técnica usada en nuestro estudio es el Ensayo Comet Alcalino (Alkaline single-cell gel electrophoresis). De forma general, el ensayo comet alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de la agarosa, lisis con

detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN y electroforesis, neutralización, tinción y análisis.

Cuando se embebe una célula en el gel de agarosa, se crea una cavidad. Tras la lisis, todas las proteínas se liberan y se diluyen en el gel, permaneciendo únicamente las proteínas de andamiaje nucleares o *nuclear scaffold proteins*, expandiéndose todo el ADN superenrollado o “nucleoide” por la cavidad (Östling y Johanson, 1984). El ADN queda negativamente cargado tras el desenmarañamiento alcalino, y en la electroforesis se dirige hacia el ánodo, excepto aquellos lazos del ADN que contienen fracturas, que son liberados de la estructura superenrollada y van quedando atrapados en la estructura reticular del gel. Estos lazos quedan extendidos desde la cabeza del nucleoide formando la cola del cometa (Duthie, 2003).

Estas estructuras se marcan posteriormente con colorantes fluorescentes que se unen al ADN para poder ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. El bromuro de etidio (BE) es probablemente el más usado, seguido del 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (Collins, 2004). También hay otros colorantes como el yoduro de propidio, naranja de acridina, Hoechst 33258 (Duthie, 2003), SYBR Green I y YOYO-I (Hartmann y col., 2003).

La medida de los cometas se puede llevar a cabo mediante un recuento manual o bien haciendo un análisis de imagen. El recuento mediante análisis de imagen se hace a través de una serie de paquetes de software disponibles en el mercado. En nuestro estudio el análisis se realizó con una cámara Hitachi (Standard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, Reino Unido). Estos programas proporcionan una gran variedad de parámetros relativos a los cometas. Los más usados son la longitud de la cola, intensidad relativa de fluorescencia (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola), momento de la cola (producto del porcentaje del ADN en la cola y la longitud de la misma) y porcentaje de ADN en la cabeza. De ellos, el porcentaje de ADN en la cola representa el parámetro más útil, ya que guarda una relación lineal con la frecuencia de rotura, se afecta relativamente poco por los ajustes del umbral, y permite la discriminación del daño

por encima del rango más amplio posible (en teoría, desde 0 a 100 % de ADN en la cola). Se recomienda contar 50 cometas por muestra (Collins, 2004).

Por otra parte, es posible calcular el daño del ADN usando únicamente nuestros ojos. Con un entrenamiento adecuado, los órganos visuales son totalmente capaces de discriminar diferentes grados de daño en función del aspecto que presente el cometa que se encuentre en ese momento en el campo de visión. De forma general, se establecen cinco clases de cometas, numerados del 0 al 4 (Duthie, 2003; Collins, 2004), en función de la ausencia de cola (0) y de la forma, tamaño, e intensidad de la cabeza y cola (1 al 4), como se nos muestra en la *Figura 14*.



Figura 14. Clasificación de los tipos de cometas en función del daño en el ADN.

El valor 0 se le da a aquellos cometas que no presentan cola alguna y tienen una alta intensidad en la cabeza, donde el daño en el ADN es prácticamente nulo; el valor 1 se le da a aquellos cometas que presentan una cola tan pequeña que se asemeja a una aureola y una alta intensidad en la cabeza, el daño sigue siendo prácticamente nulo; el valor 2 se corresponde con cometas con una cola mayor, totalmente recta, y con una intensidad en la cabeza inferior a los anteriores, hay más daño en el ADN pero sin ser excesivo; el valor 3 se asigna a aquellos cometas que tienen una cola aún mayor que los anteriores, no es recta, sino redondeada, y la cabeza es mucho más pequeña que en los anteriores y con una intensidad mucho menor, el daño a nivel de ADN es considerable; por último, el valor 4 se da a aquellos cometas de cola extensa, muy alargada, con una cabeza pequeña, de intensidad muy baja, se considera que el daño en el ADN es máximo. En este caso, es necesario contar un número de 100 cometas por muestra.

Con el fin de cuantificar el daño oxidativo presente en los linfocitos de sangre periférica de nuestros animales, se llevó a cabo el ensayo comet alcalino descrito por Collins (Collins y col., 1996), siguiendo las recomendaciones de un grupo de expertos reunido en el 4th Internacional Assay Workshop (Ulm, Alemania, 22-25 de Julio de 2001) y recogido todo por Hartmann (Hartmann y col., 2003).

REACTIVOS.

1) Tampón de Electroforesis/Tratamiento alcalino (pH \geq 13).

- EDTA Na₂ 1 mM (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, 99+% SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Hidróxido sódico 0.3 M (Sodium hydroxide, Sigma ultra, minimum 98%; SIGMA-ALDRICH[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

2) Tampón de Neutralización (pH 7.5).

- Ácido clorhídrico 37% (Ácido clorhídrico 37%, PA-ACS-ISO, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España) para ajustar pH.
- Tris Base 0.4 M (SIGMA 7-9[®] SIGMA[®], BioChemika. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

3) Tampón de Lisis (pH 10).

- Cloruro sódico 2.75 M (Sodium Chloride, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- DMSO 10% (Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- EDTA Na₂ 0.11 M.
- Tris Base 11 mM.
- Triton[®] X-100 1% v/v (Triton[®] X-100 Sigma Ultra. SIGMA-ALDRICH[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

4) Agarosas.

- Agarosa de bajo punto de fusión 1% (Agarose Low melting point. Invitrogen[™]. Invitrogen, Ltd. Paisley, Escocia, Reino Unido).

- Agarosa de grado electroforesis 1% (Agarose electrophoresis grade. Invitrogen™. Invitrogen, Ltd. Paisley, Escocia, Reino Unido).

TÉCNICA.

El ensayo discurre a través de ciertos pasos que se explican a continuación:

1.- Aislamiento de linfocitos.

Se tomaron 30µl de sangre que fueron introducidos en un tubo eppendorf con 1ml de una solución estéril de suero bovino fetal al 10% (Sigma-Aldrich) y medio modificado RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) en proporción 1:9 respectivamente. Se agitó suavemente y se mantuvo 30 minutos a 4°C y oscuridad. Transcurrido este tiempo se depositó suavemente en el fondo del eppendorf 100µl de Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU) y se centrifugó a 200xg durante 3 minutos a 4°C y oscuridad.

A continuación se lavaron las células recogiendo la interfase rosácea (células blancas) y mezclándolas con 500µl de PBS 1X (PBS 10X pH7.4, GIBCO®, Invitrogen™, EEUU) a pH 7.4, y se volvió a centrifugar a 200xg durante 3 minutos (4°C y oscuridad).

2.- Inclusión de los linfocitos en agarosa.

Las células fueron mezcladas con 85µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% precalentada y atemperada a 37-40°C, y depositadas en una capa de agarosa (1%) de punto de fusión normal previamente dispuesta en un portaobjetos.

3.- Lisis de las células.

El portaobjetos se introdujo en el tampón de lisis durante 1 hora (4°C, oscuridad), para la ruptura de las estructuras celulares.

4.- Tratamiento alcalino.

Posteriormente se colocaron en una cubeta de electroforesis CONSORT (Consort, Bélgica) con el tampón correspondiente durante 40 minutos a 4°C, con el fin de que se produzca el desenmarañamiento o separación de las cadenas de ADN.

5.- Electroforesis.

Transcurridos los 40 minutos de tratamiento alcalino, se inició el proceso electroforético con un voltaje de entre 0.7 y 1.0 V/cm, con un amperaje no superior a 300mA. El tiempo de electroforesis fue de 30 minutos (4°C), se empleó como fuente de alimentación CONSORT E802 (Consort, Bélgica).

6.- Neutralización.

Una vez terminada la electroforesis, la muestras se neutralizaron del exceso de álcali mediante tres lavados de 5 minutos cada uno (4°C).

7.- Tinción del ADN y visualización de los cometas.

La tinción de las muestras se realizó con DAPI 1mg/ml (4,6-diamidino-2-phenylindole, SIGMA®. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU), durante 15 minutos.

Los cometas se examinaron bajo un microscopio-UV Leica DMLS con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400 (Leica Microsystems. Nusstoch, Alemania). El análisis se realizó con una cámara Hitachi (Standard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, Reino Unido).

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Se contaron un total de 50 cometas por muestra. El parámetro utilizado para la expresión de los resultados fue el % ADN en cola.

II.3.3.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HIDROXITIRO SOL Y SU METABOLITO ALCOHOL HOMOVANÍLICO.

La cuantificación de los niveles de HT y su metabolito alcohol homovanílico se realizó siguiendo el método descrito por Miro-Casas y colaboradores en muestras plasmáticas, usando para ello el tándem cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CG/EM) (Miro-Casas y col., 2003). Estas determinaciones fueron llevadas a cabo en la

unidad de lípidos y epidemiología cardiovascular del Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) (Barcelona, España) por la Doctora María Isabel Covas.

REACTIVOS.

- 3-(4-hidroxifenil)-propanol (SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol (alcohol homovanílico) (SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- 4-metilcatecol (SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Acetato de etilo (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- Acetonitrilo, grado HPLC (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico 0.5 M (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Ácido perclórico 700g/L (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- Hidróxido sódico 1 M (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Hidroxitirosol (3,4-hidroxifeniletanol) sintetizado de acuerdo con el método descrito por Baraldi y colaboradores (Baraldi y col., 1983).
- Metabisulfito sódico 1 M (SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Metanol (SCHARLAU. Scharlau Chemie, SA. Barcelona, España).
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (MACHEREY-NAGEL. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania).
- Yoduro de amonio (NH₄I) (MERCK. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

CURVAS DE CALIBRACIÓN Y MUESTRAS CONTROL.

Se prepararon las soluciones de trabajo de hidroxitirosol (HT) (1.4µg/ml) y alcohol homovanílico (AH) (1µg/ml) en metanol.

Para la elaboración de las curvas de calibración se añadió a 1ml de plasma (libres de las sustancias de referencia) la cantidad adecuada de cada una de las soluciones de trabajo de HT y AH, así como 15ng de estándar interno (solución metanólica de 10µg/ml de 3-(4-hidroxifenil)-propanol), quedando la curva de calibrado para el HT en el rango de concentraciones 2.1-42ng/ml y 1.5-30ng/ml para el AH. Las muestras control se

prepararon en concentraciones 10.5, 21 y 35ng/ml para el HT, y 7, 15 y 25ng/ml para AH.

HIDRÓLISIS ÁCIDA, EXTRACCIÓN Y DERIVATIZACIÓN DEL PLASMA.

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida se adicionaron 15ng de estándar interno y 100µl de una solución 1M de metabisulfito sódico a 1ml de plasma, 60µg de 4-metilcatecol para prevenir la unión de los compuestos fenólicos a las proteínas y ácido clorhídrico 0.5 M y se incubó la mezcla durante 20 minutos en una baño seco a 100°C. Una vez a temperatura ambiente, se añadieron 75µl de ácido perclórico a una concentración de 700 g/L con el fin de precipitar las proteínas, momento tras el cual se ajustó el pH de la mezcla entre 3 y 3.5 con hidróxido sódico 1 M. Se centrifugó a 300xg durante 5 minutos, siendo transferido el sobrenadante a tubos de cristal para su posterior extracción líquido-líquido con 4ml de una mezcla de acetonitrilo/acetato de etilo (proporción volumétrica 1:4). Una vez agitado durante 30 minutos y centrifugado a 300xg (5 minutos), la fase orgánica se evaporó y los residuos fueron derivatizados con 75µl de una mezcla de MSTFA/ NH₄I/2-mercaptoetanol (2g de NH₄I y 6ml de 2-mercaptoetanol por litro de MSTFA) durante 60 minutos a 60°C.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

La cuantificación de HT y AH se realizó en 2µl de la muestra derivatizada mediante un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM), equipado con un cromatógrafo de gases HP5980, un detector masa-selectivo HP5973 y un inyector HP7683 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). La separación de los compuestos fue realizada con una columna capilar de fenilmetil silicona entrecruzada al 5% HP Ultra 2 (12.5m de longitud x 0.2mm de diámetro interno y 0.33µm de grosor de capa) (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EEUU) (Covas y col., 2006a).

Las condiciones del sistema fueron las que siguen:

- Gas portador (Fase móvil): 1ml/min de helio a 180°C.
- Horno del CG: programado de 80 a 200°C (15°C/min) y de 200 a 280°C (25°C/min), siendo en este último el que se mantuvo durante 3 minutos.

- Tiempo total de paso 15 minutos.
- Las muestras plasmáticas se inyectaron casi al completo (modo *splitless*) de modo que los analitos se acumularan en la cabeza de la columna, debido a la baja concentración de los analitos.
- Detector: accionado en modo detección ión-simple, los compuestos fueron ionizados por impacto de electrones.

Para las determinaciones cuantitativas se identificaron los iones del estándar interno, HT y AH en las m/z (razón masa/carga) 206, 370 y 312 respectivamente, tanto de las muestras como de la curva de calibración, expresándose los resultados como ng/ml.

II.3.4.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO: TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA Y TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA (KI67).

II.3.4.1.- TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA.

Tanto las muestras biopsiadas como los tumores extirpados tras el sacrificio fueron procesadas para su inclusión en bloques de parafina. Para ello, se incluyeron en el procesador de tejidos Leica ASP 300 (Leica, Wetzlar, Alemania) mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Formaldehído 3,94% (2 horas)
- 2.- Etanol al 70% (2 horas)
- 3.- Etanol al 96% (2 horas)
- 4.- Etanol absoluto (3 pases de 1 hora: total 3 horas) (Panreac, Barcelona, España)
- 5.- Sustituto del Xileno (3 pases de 1 hora: total 3 horas) (Neoclear:Isoparafina H, Panreac, Barcelona, España)
- 6.- Parafina líquida (3 pases, los dos primeros de 1 hora y el último de 2 horas) (Histosec Pastillas, Merck. Damstadt, Alemania).

Seguidamente los bloques fueron montados mediante el montador (Tissue-Tek, Sakura, Torrance, USA), depositados sobre la placa fría e incubado 20 minutos a 4°C

con el objetivo de enfriar la superficie del bloque para facilitar el corte. A continuación, se ensambló cada bloque en el microtomo y se cortó su superficie hasta que ésta quedó igualada para obtener un corte representativo de la muestra. Tras programar el espesor del corte a 3 μm , se llevaron a cabo varios cortes seriados del bloque que, con ayuda de una aguja histológica, se depositaron en una bañero de agua suplementado con etanol absoluto para extender los cortes y evitar pliegues. Una vez extendidos, se recogieron los cortes con un portaobjetos limpio y se dejaron secar portaobjetos de 76x26mm (Menzel Glaser®, Braunschweig, Alemania) en una estufa a 37°C durante 1 hora. Acto seguido se tiñeron mediante el uso de la técnica de hematoxilina y eosina mediante teñidor automático (Autostainer XL, LEICA. Wetzlar, Alemania) aplicando el siguiente protocolo:

1.- Desparafinar mediante microondas durante 5 minutos, dos pases de 5 minutos con Neoclear e hidratar con alcoholes decrecientes hasta agua.

2.- Teñir con hematoxilina de Harris (Hx 747515, Merck, Damstadt, Alemania) durante 5 minutos.

3.- Lavado con agua corriente.

4.- Diferenciar en agua amoniaca (5%) durante varios segundos.

5.- Azular con agua corriente durante 3 minutos.

6.- Colorear con eosina (Eosina de Etilo, Carlo Erba Reagenti SpA. Rodano, Italia).

7.- Deshidratar mediante alcoholes crecientes de 70% (2 minutos), 96% (2 minutos) y absoluto (2 minutos) y aclarar en dos neoclear durante segundos.

9.- Montaje con cubre de 24x60mm (Hirschmann Laborgeräte. Eberstadt, Alemania) mediante montador automático CV 5030 (Leica, Wetzlar, Alemania).

Tras esta tinción se procedió al estudio histopatológico de las muestras llevado a cabo por un patólogo experto siguiendo los criterios histopatológicos de malignidad que se detallan a continuación:

a) Gradación de Bloom-Richardson en tres grados: I(3-5); II(6-7); III(8-9) según la siguiente baremación:

- Atipia nuclear (1 a 3) en base al tamaño y forma de los núcleos, su cromatina y la presencia de nucleolos.

- Patrón arquitectural. Porcentaje de área sólida. 1= <25%; 2= 25-75%; 3 = >75%.

- Número de mitosis. 1= 0-9/10CGA; 2= 10-19/10CGA; 3= >19/10CGA.

b) Patrón arquitectural:

- Cribiforme (>70 de este patrón).

- Mixto (30-70% del patrón cribiforme y el resto del papilar).

- Papilar (< 30% de patrón cribiforme).

- Otros: Sólido, tubular.

II.3.4.2.- DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE EL ANTICUERPO KI67.

El punto de partida para esta técnica es la muestra adherida al portaobjetos, acto seguido se procedió a la recuperación o desenmascaramiento antigénico. Para ello se utilizó un equipo automático de recuperación antigénica que constaba de dos tanques con tampón de desenmascaramiento diluido en agua destilada (dilución 1:10), a pH 6. A continuación, se dispusieron las muestras en una gradilla y se sumergieron en el tampón. Tras introducir los tanques en la cámara del equipo se programó el desenmascaramiento antigénico según los siguientes parámetros:

- Pre-tratamiento: aumento gradual de la temperatura de 23°C a 97°C.
- Desenmascaramiento: 97°C durante 20 minutos.
- Enfriamiento: disminución gradual de la temperatura de 97°C a 65°C.

El tampón de desenmascaramiento fue sustituido por tampón de lavado diluido con agua destilada (dilución 1:10) donde se incubaron los portaobjetos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la inmunotinción se empleó un equipo automático y software específico. En primer lugar se programó el equipo según el protocolo especificado para dicho anticuerpo. Una vez programado, el mismo equipo estableció los reactivos y el orden en el que éstos debían ser cargados en el reservorio. De forma general, la reacción de

inmunotinción se basa en la adicción a la muestra de un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico en la superficie del corte histológico.

Una vez llevada a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, se añade una solución bloqueante con el objetivo de neutralizar las peroxidases endógenas contenidas en la muestra y minimizar la inmunotinción inespecífica, pues el sistema de inmunodetección se basa en la unión al complejo antígeno-anticuerpo de un polímero compuesto de un esqueleto de dextrano al que se acoplan hasta 100 moléculas de peroxidasa de rábano y hasta 20 moléculas de anticuerpo secundario anti-ratón/conejo (solución de detección).

Por último se añadió el sustrato, consistente en una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) que fue previamente diluida en un tampón orgánico comercial (dilución 1:50), y una solución de hematoxilina específica para el equipo de inmunotinción.

La peroxidasa acoplada al polímero cataliza la peroxidación de la DAB, que vira a un color marrón en el lugar de unión del antígeno con el anticuerpo. La hematoxilina tiñe el núcleo de las células (*Tabla 4*).

Tabla 4. Resumen del protocolo de inmunotinción para Ki67.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (μl)</i>	<i>Tiempo de incubación (minutos)</i>
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
Solución bloqueante	200	5
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
Anticuerpo anti-ki67*	200	10
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
Solución de detección	200	20
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
DAB+Cr	200	5
DAB+Cr	200	5
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
Hematoxilina	200	7
Tampón de lavado	Exceso (2-3ml)	0
Agua destilada	Exceso (2-3ml)	0

*Solución comercial de anticuerpo pre-diluida

Para finalizar, los portaobjetos fueron extraídos de la cámara del equipo automático de inmunotinción, ordenados en una gradilla e introducidos en un tanque con agua destilada. El tanque con los portaobjetos se ensambló en la cámara de un equipo teñidor automático con el objetivo de deshidratar y parafinar las muestras, por lo que se programó para llevar a cabo exclusivamente estas dos tareas, que implicaron 3 lavados consecutivos en soluciones etanólicas al 70%, 80% y 100% y dos inmersiones en isoparafina. Los portaobjetos fueron transferidos a un equipo montador automático.

En el estudio se incluyó un control externo positivo (carcinoma de mama humano) y un control negativo, consistente en no añadir el anticuerpo primario a una muestra de tumor murino.

Tras la inmunotinción se procedió al análisis microscópico en el que las muestras fueron evaluadas por un patólogo experto que estableció la expresión de cada marcador en términos cuantitativos (porcentaje de células tumorales positivas por sección) y cualitativos (positivo/negativo).

II.3.5.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA CON LA PLATAFORMA GENECHIP® DE AFFIMETRIX® (*RAT GENOME 230 2.0 ARRAY*).

La realización de los microarrays fue encargada a la empresa PROGENIKA BIOPHARMA, SA. (Vizcaya, España). El análisis de expresión génica se ha realizado utilizando la tecnología GeneChip® de Affymetrix®, usado como el sistema de array del genoma de rata Rat Genome 230 2.0, capaz de analizar hasta 30.000 transcritos y variantes de más de 28.000 genes de rata. Tanto el procesamiento de las muestras como la hibridación, revelado, escaneado de los chips y análisis de los resultados se ha realizado siguiendo los protocolos y equipos oficialmente recomendados por Affymetrix Inc. (Santa Clara, CA, EEUU). A partir del ARN total obtenido se ha sintetizado ARNc con el que, después de fragmentar, se ha preparado la mezcla de hibridación con la que hibridar los chips correspondientes, según el estudio a realizar y el organismo del que proceda la muestra. El software utilizado para el procesamiento de los chips y de los resultados ha sido el Gene Chip Operating Software (GCOS 1.4, Affymetrix®). El software utilizado

para el análisis bioinformático incluye varios programas: GeneSpring GX v7.3 (Agilent), dChip (www.dchip.org) y los paquetes “Affy” y “affyPLM” del consorcio BioConductor (www.bioconductor.org).

II.3.5.1.- SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para la selección de las muestras, se ha tenido en cuenta la gradación de Bloom-Richardson, patrón histológico utilizado para la valoración de los carcinomas. Dicho patrón valora el carcinoma en función de los siguientes parámetros de baremación: atipia nuclear (valor asignado de 1 a 3) en base al tamaño y forma de los núcleos, su cromatina y la presencia de nucléolos; patrón arquitectural (valor asignado de 1 a 3 en base al porcentaje de área sólida: 1= <25%; 2= 25-75%; 3= >75%); número de mitosis (valor asignado de 1 a 3 en base a: 1= 0-9/10CGA o Campos de Gran Aumento; 2= 10-19/10CGA; 3= > 19/10CGA). En base a estas premisas, una vez que se asigna a una muestra el valor correspondiente a cada uno de esos parámetros, tras el recuento final, se establece un grado de Bloom-Richardson de tres tipos: I (valor de recuento final de 3-5), II (6-7) y III (8-9). Así pues, tras la asignación del grado de Bloom-Richardson a cada uno de los animales de los grupos estudiados (DMBA, HT y ADR) se eligieron aquellos que presentaron el grado II.

Con todo esto, las muestras seleccionadas para el estudio de perfil génico fueron aquellas de grado II, con una $n=5$ para cada grupo, no obstante, como se analizaron los tumores al principio (antes de la inoculación de la adriamicina e hidroxitirosol) y al final, se obtuvo una n final de 30.

II.3.5.2.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS: EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN.

Como paso previo a todas las purificaciones, el tejido se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido. A partir del pulverizado se extrajo ARN total directamente con RNeasy Mini kit de Qiagen (Germantown, MD, EEUU), utilizando como método de homogeneización las columnas de QIAshredder (Qiagen). La cantidad y calidad del ARN

obtenido, estimados mediante chequeo de una alícuota en un gel de agarosa (*Figura 15*) y medida espectrofotométrica (Absorbancia 260/280), fue suficiente para los análisis de GeneChip.

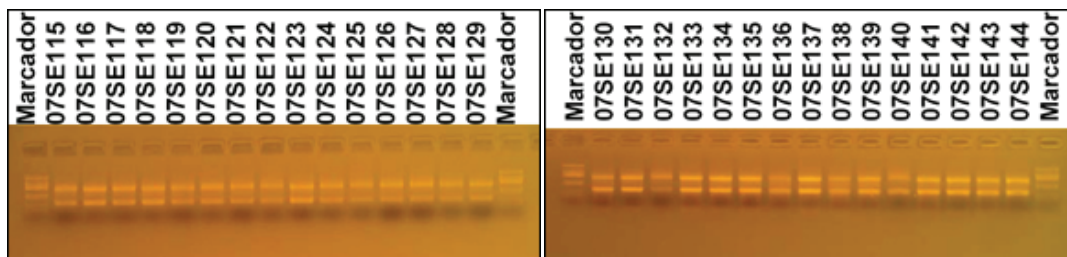


Figura 15. Comprobación de los ARN purificados por electroforesis en gel de agarosa.

(Sobre el bandeo aparecen reflejados los códigos asignados a las muestras)

II.3.5.3.- SÍNTESIS DE ARN COMPLEMENTARIO BIOTINILADO.

A partir de 2 μ g de cada una de las muestras, se sintetizó ADNc (ADN complementario) con el One-Cycle ADNc Synthesis kit de Affymetrix, siguiendo el protocolo del Expression Analysis Technical Manual de Affymetrix. A partir de este ADNc se sintetizó ARNc (ARN complementario) siguiendo el protocolo del IVT Labeling kit de Affymetrix. El ARNc así sintetizado, se purificó con el GeneChip Sample Cleanup Module de Affymetrix, recuperándose en un volumen de 22 μ l de agua. Dichos ARNc purificados, fueron, posteriormente comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa y medida espectrofotométrica (Absorbancia 260/280) (*Figura 16*).

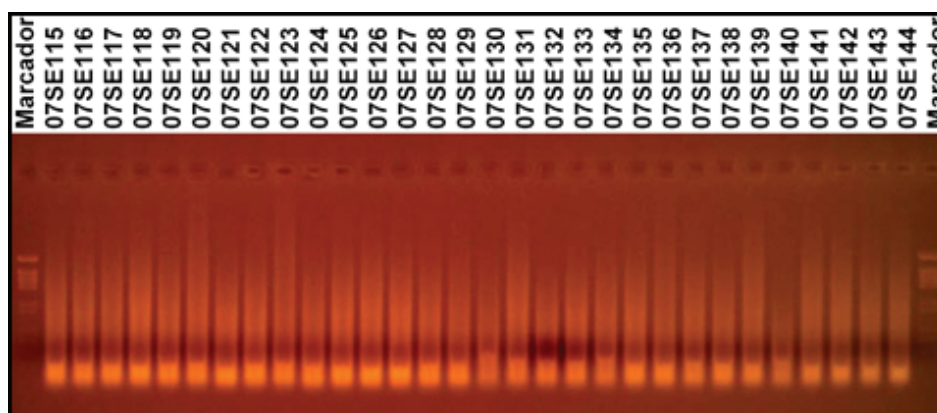


Figura 16. Chequeo de los ARNc purificados por electroforesis en gel de agarosa.

(Sobre el bandeo aparecen reflejados los códigos asignados a las muestras)

Una vez sintetizado y purificado, se fragmentó el ARNc (15µg de cada preparación) para preparar las mezclas de hibridación. Nuevamente, la comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa es esencial (*Figura 17*).

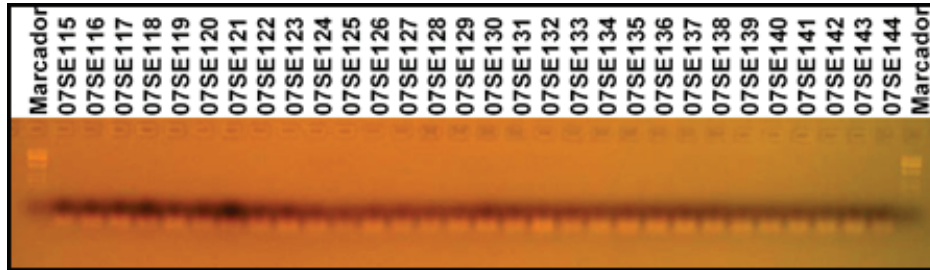


Figura 17. Comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa de los ARNc fragmentados.

(Sobre el bandeado aparecen reflejados los códigos asignados a las muestras)

II.3.5.4.- HIBRIDACIÓN Y ESCANEADO DEL *RAT GENOME 230 2.0 ARRAY*. ANÁLISIS DE LOS CONTROLES.

La hibridación se llevó a cabo incubando los ARN marcados con biotina obtenidos en las etapas anteriores con oligonucleótidos complementarios incluidos sobre el soporte sólido del microchip.

La inspección visual de los arrays proporciona una idea general de la calidad del experimento. Puede considerarse como válida una imagen con fondos oscuros y señales de hibridación brillantes, mientras que una muestra problemática, mala hibridación o incorrecta adquisición por el scanner, puede resultar en elevadas señales de fondo y de ruido que ocultarían la señal real.

Una vez observadas las imágenes de cada chip, existen dos parámetros fundamentales para valorar la calidad de las mezclas de hibridación: la presencia de los *spike controls* y la relación 3'/5' de los genes *housekeeping*.

Los *spike controls* son sondas control para secuencias que se incluyen en la mezcla de hibridación. La presencia de estos controles indica que los procesos de hibridación,

lavados, revelado y escaneado han resultado correctos. Los *spike controls* utilizados son BioB, BioC, BioD y Cre. El BioB es el control menos representado en la mezcla, por lo que es el principalmente utilizado para valorar la sensibilidad del experimento.

Los *housekeeping controls* son sondas para genes expresados constitutivamente en todo tipo de tejidos. Se encuentran en el array sondas correspondientes a las zonas 3', central y 5' de estos genes. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a la de las 5' indica la integridad de los ARNc sintetizados, siendo ésta reflejo de la calidad del ARN original utilizado para la síntesis. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica integridad total del ARN y ARNc sintetizado. En función del órgano de procedencia de la muestra y del tratamiento aplicado, y dado que las condiciones no siempre son las ideales, es difícil obtener un ARNc totalmente íntegro, por lo que el criterio para considerar un experimento como satisfactorio (siguiendo las recomendaciones de Affymetrix), es que la relación 3'/5' no debe superar el valor de 3. Por otra parte, el carácter constitutivo de los genes representados como *housekeeping* no siempre se cumple para todo tipo de tejidos o condiciones experimentales, tal y como está ampliamente reflejado en la literatura. Así, entre los genes representados en el array, el que más frecuentemente se comporta como verdadero *housekeeping* es GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Se llevó a cabo el escalado de los datos de cada array, con el fin de minimizar las discrepancias debidas a variables tales como la preparación de la muestra, la hibridación, etc. Usando el software de Affymetrix GCOS 1.4, todos los arrays se escalaron definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 200. GCOS calcula la intensidad media de todo el array promediando los valores de intensidad de todos los sets de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esa intensidad media es multiplicada por un factor de escalado que la convertirá en el valor definido por el usuario (en este caso 200). El factor de escalado de los arrays del mismo experimento debe ser próximo entre ellos (sin que el factor de escalado de un array sea superior a tres veces el de cualquiera de los otros) y cercano a 1 en la medida de lo posible.

II.3.5.5.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS SECUENCIAS SIGNIFICATIVAS.

El análisis funcional de los genes se realizó a los grupos de estudio DMBA, HT y ADR, usando las herramientas informáticas DAVID (DAVID Bioinformatics. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) y PANTHER (PANTHER Classification System. <http://www.pantherdb.org/>), realizando una clasificación ontológica según el proceso biológico en el que el gen está implicado.

En el caso de la herramienta DAVID, ésta permite clasificar los genes según sus procesos biológicos con las anotaciones ontológicas procedentes de varias fuentes (EntrezGene, EMBL-EBI o UniProt). En cualquier caso, esta herramienta bioinformática nos da la oportunidad de escoger el nivel ontológico deseado. Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org>) es un proyecto que aúna un vocabulario establecido y controlado para describir genes y productos de genes de cualquier organismo. Los términos ontológicos son: componente celular, proceso biológico y función molecular; en el caso que nos ocupa, los procesos biológicos constituyen una serie de niveles que van desde el más general (1) al más específico (5). Para nuestro estudio usamos el nivel 3 de la clasificación por procesos biológicos de Gene Ontology.

En el caso de la herramienta PANTHER, éste nos permite realizar una clasificación ontológica basándose en sus propios términos ontológicos para describir dichos procesos, usando como base de datos génica la suya propia, de NCBI, Celera, etc. En el trabajo aquí mostrado se realiza una clasificación usando como base de datos NCBI, y se seleccionan algunos de los procesos en los que están implicados los genes obtenidos en el microarray (apoptosis; ciclo celular; proliferación celular y diferenciación; estructura celular y movilidad; inmunidad, defensa y respuesta inflamatoria; metabolismo esteroideo, lipídico y de ácidos grasos; metabolismo de nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, factores de transcripción; oncogénesis; metabolismo y modificación de proteínas; transducción de señales).

La selección de los genes para su posterior validación por RTPCR se llevó a cabo siguiendo un orden específico: elección prioritaria de las secuencias con un cambio de expresión ≥ 1.8 y ≤ 0.5 , eliminando aquellas aún sin identificar, predicciones y la extensa mayoría de los LOCUS (dejando las que poseían sondas de hibridación para realizar la RTPCR). Puesto que el número superaba las 90 secuencias, se decidió usar dos placas, razón por la cual se incluyeron aquellos genes que no cumplían las restricciones iniciales de cambio de expresión hasta alcanzar un número de 185. Cumpliendo todas las secuencias, sin excepción, una significación estadística $p < 0.05$.

II.3.6.- VALIDACIÓN DE LOS GENES OBTENIDOS DEL ENSAYO MICROARRAY A TRAVÉS DE QRTPCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL CUANTITATIVA, *QUANTITATIVE REAL TIME PCR*).

El análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa se ha realizado utilizando la tecnología de Low Density Arrays (o Microfluidic Cards) 7900HT de Applied Biosystems (Applied Biosystems. CA, EEUU) (*Figura 18*).

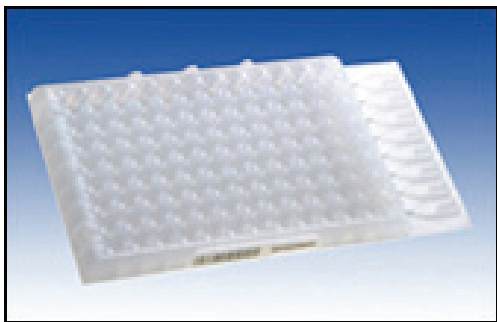


Figura 18. Imagen correspondiente a una tarjeta microfluidica de 384 pocillos de Applied Biosystems.

El análisis de las muestras y de los resultados ha sido realizado en las instalaciones de PROGENIKA BIOPHARMA y el procesamiento de las placas en los laboratorios del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) (Universidad de Navarra. Pamplona, Navarra, España).

La tecnología de Low Density Arrays se basa en la tecnología TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EEUU) para la detección del producto amplificado por PCR mediante el método llamado nucleasa 5' (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Applied Biosystems, CA, EEUU). La detección con sondas TaqMan se basa en la utilización de un fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar (Amplicon). Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente (Reporter) y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (Quencher), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (*Figura 19*).

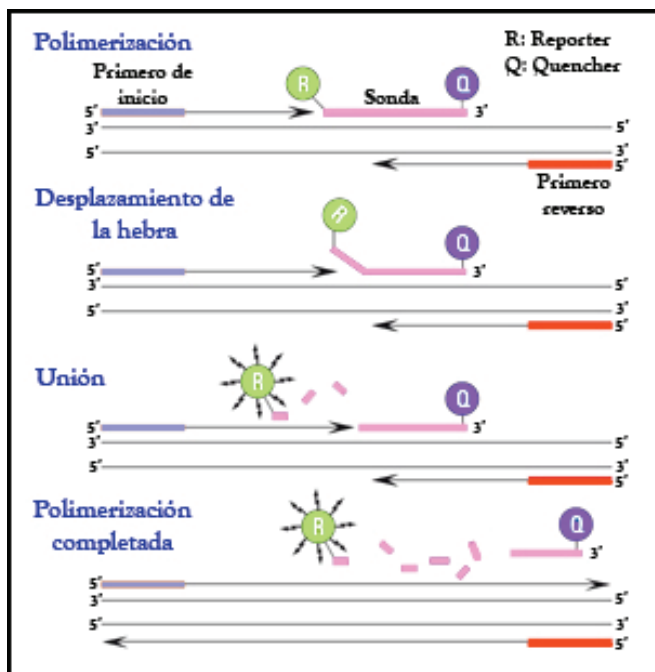


Figura 19. Esquema que representa la reacción de la nucleasa 5'.

II.3.6.1.- PLACAS MICROFLUÍDICAS O ARRAYS DE BAJA DENSIDAD DE TAQMAN®.

Los experimentos basados en placas o tarjetas microfluídicas funcionan como un array, y usan un proceso de RT-PCR (Real Time PCR) de dos pasos. En el paso de

transcripción inversa (RT), el ADN complementario (ADNc) es retro transcrito de muestras de ARN total, usando primeros o cebadores aleatorios. En el paso PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa), se sintetizan los productos de la reacción PCR a partir de ADNc, empleando para ello el ensayo de la nucleasa 5' (Material y Métodos. Apartado II.3.6.). Estas tarjetas permiten usar el sistema 7900HT para determinar el perfil de expresión génica usando el método comparativo de cuantificación relativa C_T (*Threshold cycle*, ciclo de la PCR en el que la fluorescencia tiene el valor umbral por encima del cual la fluorescencia es específica, que define el ciclo para el que cada muestra alcanza una expresión determinada, y que depende del número de copias de partida).

Las placas microfluídicas contienen 8 reservorios (donde se aplica la muestra) y 384 pocillos (*Figura 20*), cada uno de los cuales contienen ensayos (genes que se pueden estudiar con esta técnica) TaqMan validados por Applied (TaqMan[®] Gene Expression Assays. Applied Biosystems. CA, EEUU). Cada placa permite la amplificación y evaluación tanto de un control endógeno, como de uno a ocho muestras de ADNc generado durante la retro transcripción. El diseño de las placas elegido fue el de 95 genes +1 control (*Housekeeping* 18S) analizados por duplicado y con dos muestras estudiadas en cada placa. El número de placas del análisis fue de 20 por cada diseño lo que sirvió para analizar un total de 40 muestras.



Figura 20. Detalle de los reservorios y pocillos de una tarjeta microfluídica.

II.3.6.2.- SELECCIÓN DE LOS ENSAYOS TAQMAN.

Los ensayos TaqMan[®] conforman una amplia colección de sondas y primeros o cebadores prediseñados, para llevar a cabo de forma sencilla estudios de expresión génica en genes de humanos, ratones, ratas, *Arabidopsis*, y *Drosophila*. Estos ensayos se basan en la química de la nucleasa 5' de Applied Biosystems, y consiste en dos cebadores PCR no unidos y una sonda MGB de TaqMan unida a un colorante fluorescente (FAM[™]. Applied Biosystems. CA, EEUU) en el extremo 5', que actúa como *Reporter*, y en el extremo 3' un *Quencher* (TAMRA[™]. Applied Biosystems. CA, EEUU).

La elección de los genes para la RTPCR se llevó a cabo a partir de los genes con significación estadística $P < 0.05$ obtenidos del microarray. Hay que tener en cuenta que para las placas sólo se pueden seleccionar aquellos ensayos que están inventariados y si existe más de una opción se seleccionarán aquellos en función de los siguientes criterios:

- La distancia del conjunto de sondas de Affymetrix a la sonda de Applied será la mínima posible.
- El ensayo no tendrá posibilidad de detectar ADN genómico y si no es posible se seguirá su elección en el siguiente orden:
 - o La sonda se localiza entre las uniones de dos exones y no detectará ADN.
 - o Los cebadores y las sondas están localizadas en un único exón, por lo que detectarán ADN genómico.
 - o Aunque la sonda se localice en una unión entre exones, puede detectar ADN si está presente en la muestra.
 - o Ensayos diseñados para detectar un transcrito perteneciente a una familia de genes con alta homología de secuencia. Están diseñados de forma que la diferencia en el valor C_T entre el gen a estudiar y el que tenga la secuencia más homóloga debe situarse entre 10 y 15 veces.
- Se seleccionarán un número de *housekeeping* (sondas de genes constitutivos) para el proceso de normalización y cuyo número será como mínimo de cuatro.

Los *housekeeping* seleccionados en nuestro estudio fueron los siguientes: Actb (actin, beta), Akr1a1 (aldo-keto reductase family 1, member A1), Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase); Rpl10 (Similar to ribosomal protein L10), Rps6 (ribosomal protein S6) y 18S (control seleccionado por defecto por Applied).

II.3.6.3.- GENERACIÓN DE ADNc POR TRANSCRIPCIÓN INVERSA A PARTIR DE ARN TOTAL.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo usando el *High Capacity cDNA Archive Kit* de Applied Biosystems (Applied Biosystems. CA, EEUU), a partir de muestras de 1µg de ARN total procedente de las muestras seleccionadas anteriormente. Este kit contiene reactivos suficientes para realizar 200 reacciones de retro transcripción con un volumen de reacción de 100µl.

Para realizar la retro transcripción (RT) se usó el TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems. CA, EEUU) con una concentración 2X. Se pipetaron 50µl de la mezcla de RT 2X [Tampón de Transcripción Reversa 10X, deoxiNTPs 25X, mezcla aleatoria de cebadores 10X (para ARN total será una mezcla de hexámeros), Retro Transcriptasa MultiScribe™ 50 U/µl (Applied Biosystems. CA, EEUU), agua libre de RNasas, Cloruro de magnesio 25mM, inhibidores de RNasas] en cada uno de los 96 pocillos de una placa de reacción (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate. Applied Biosystems. CA, EEUU). Acto seguido, se adicionan 50µl de la muestra de ARN correspondiente a la mezcla maestra, se mezcla cuidadosamente usando la propia pipeta, y se cubre la placa. Tras una breve centrifugación, se introduce la placa de reacción en un termociclador 7900HT con las siguientes condiciones: **Paso 1:** 25°C durante 10 minutos; **Paso 2:** 37°C durante 120 minutos.

II.3.6.4.- AMPLIFICACIÓN DEL ADNc MEDIANTE PCR.

La amplificación del ADNc es el segundo paso del experimento de RT-PCR de dos pasos. Aquí, se carga la mezcla PCR de muestra en un Array TaqMan®, precargado con

ensayos TaqMan, llevado a cabo en un sistema 7900HT para análisis RT-PCR cuantitativa.

Para realizar este proceso, se mezclaron 50µl de muestra de ADNc (100ng) y agua libre de RNasa, con 50µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® (2X) (AmpliTaq Gold® DNA polymerase, dNTP con dUTP, Passive Reference, y componentes de tampón optimizado) (Applied Biosystems. CA, EEUU). Obteniendo de este modo, la mezcla de reacción PCR.

Tras la agitación y centrifugación, se pipetearon 100µl de la misma en el reservorio correspondiente de la placa microfluidica (*Figura 21*).

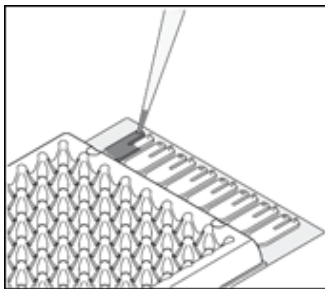


Figura 21. Detalle de la carga de mezcla de reacción PCR con ADNc en su correspondiente reservorio de una tarjeta microfluidica.

Una vez llenos los reservorios, se centrifuga la placa dos veces consecutivas en una centrífuga Heraeus® Multifuge® 3L-R (DJB Labcare Ltd. Buckinghamshire, Reino Unido) con rotor de brazos basculantes y adaptadores de Applied adecuados a los arrays de baja densidad (1200rpm, 1 minuto), se selló y se recortaron los reservorios.

Una vez preparado el TaqMan Array, se creó un archivo de cuantificación relativa con el software Sequence Detection Software (SDS) v2.2 (Applied Biosystems. CA, EEUU), y se procedió al análisis en un sistema 7900HT. Las condiciones del termociclador fueron las que siguen:

PCR usando un TaqMan Universal PCR Master Mix 2X	Pasos iniciales		PCR (40 ciclos)	
	Activación de AmpErase [®] UNG	Activación de AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	Calentar	Atemperar
	Continuo	Continuo	Ciclo	
	2 min, 50°C	10 min, 95°C	5seg, 95°C	1min, 60°C

II.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico de los resultados ha sido dividido en tres categorías fundamentales:

- 1) Análisis estadístico de los parámetros analíticos.
- 2) Análisis bioinformático del perfil genómico con microarray.
- 3) Análisis bioinformático de la validación mediante RTPCR.

II.4.1- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Todos los valores han sido expresados como la media y el error estándar de la media. Se ha realizado para conocer las diferencias significativas entre los grupos, un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) tras comprobar que los datos cumplen los criterios de homogeneidad de las varianzas (mediante el Test de Levene), distribución normal (mediante el test de Kolmogorov-Smirnov). Cuando no se han cumplido los dos requisitos anteriores, se procedió a transformar las variables ($1/x$) ó se llevó a cabo el Test de Tamhane *a posteriori* para varianzas no homogéneas. Para conocer entre que grupos hay diferencias significativas se realiza un “post hoc” de Bonferroni o Tukey. Aquellas variables que con la transformación continuaron sin ser normales, y para todas las variables anatomopatológicas, se realizaron test no paramétricos. En concreto, se ha empleado el Test de la H de Kruskal-Wallis para ver si existían diferencias entre los tratamientos y el Test de la U de Mann-Whitney para conocer entre que grupos había diferencias. Para detectar las significaciones para un mismo grupo al inicio y final del estudio se aplicó la T de Student para muestras relacionadas. Se han considerado diferencias significativas para un valor $P < 0.05$. Todo el análisis estadístico ha sido realizado con el programa SPSS 15.0 para Windows.

II.4.2- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PERFIL GENÓMICO CON MICROARRAY.

Con el fin de determinar si existían diferencias entre las condiciones experimentales dentro de los grupos INICIO y FINAL de tratamiento, así como la obtención de secuencias diferencialmente expresadas para cada tratamiento entre el INICIO y el FINAL del mismo, se han llevado a cabo los siguientes pasos:

- a) Control de calidad de los arrays.
- b) Pre-procesamiento de los datos por el método RMA.
- c) Normalización de los arrays para realizar comparaciones entre muestras.
- d) Filtrado de los datos para eliminar transcritos no informativos.
- e) Agrupación no supervisada de los arrays
- f) Aplicación de herramientas estadísticas para obtener genes expresados diferencialmente.
- g) Aplicación de correcciones para obtener listas con número reducido de falsos positivos.

Para determinar la calidad de los arrays se estudió el porcentaje de transcritos detectados como presentes en un array (P call %), que en condiciones de procesamiento adecuadas sirve para evaluar la calidad de la muestra. Además, se comprobó el porcentaje de transcritos cuyos niveles en un array eran inconsistentes con los niveles en el resto de arrays del experimento (Array Outlier), el programa de análisis utilizado, dChip (www.dchip.org), recomienda tomar con precaución aquellas muestras que superen el valor de 5%, y eliminar aquellas que superen el 15%. Un valor superior indicaría una imagen potencialmente contaminada, principalmente por rastros de burbujas, arañazos o un problema a nivel de preparación o hibridación de la muestra. Por último, para comprobar la consistencia de los arrays en el experimento se usó el paquete de BioConductor “affyPLM”, para obtener valores de error estándar no escalados normalizados (valores NUSE) para cada set de sondas a partir de los valores de intensidad de cada sonda en el set.

Con el propósito de eliminar los sesgos experimentales (debido a las muestras) y sistemáticos (debido al procesado), los valores de intensidad de cada sonda en el array fueron procesados y normalizados por el método RMA (Robust Multichip Average) para obtener un valor de intensidad individual para cada set de sondas. Tras el cual se filtraron los datos normalizados de los arrays GeneChip para eliminar las secuencias control (57) y aquellas con señal de hibridación cercana al fondo (background).

El siguiente paso constituye la normalización de los datos de los arrays usando el programa de análisis GeneSpring GX v7.3.1 (Agilent). Dado que el experimento incluye un conjunto de muestras pareadas, en la normalización, cada pareja de muestras apareadas se normaliza respecto de la muestra basal, que tendrá por tanto un valor de 1. Con esto se pretende definir mejor la variabilidad intermuestral que permite este tipo de diseño, no sesgando los resultados debido a factores no relacionados con el tratamiento y por tanto la calidad de los genes significativos que se obtendrá será mayor. Por otro lado, para el estudio no supervisado de las muestras y la obtención de listas de genes expresados diferencialmente entre las muestras a tiempo INICIO se aplica una normalización global a la mediana de cada set. Por último, en las listas de genes expresados diferencialmente se muestran los datos normalizados como valores de cambio en expresión (Fold Change, FC) entre condiciones. Para ello, los datos de las condiciones experimentales que se comparan se normalizan frente a la mediana de los arrays de la línea base considerada en cada caso y que será la que se encuentra en segundo lugar en la comparación (Ej: A vs. B Se normaliza A y B respecto de B). Los valores de FC para los arrays de la condición línea base (B en el ejemplo) serán por tanto cercanos a 1.

Para eliminar aquellas sondas que no presentan ningún cambio de expresión entre las distintas condiciones experimentales, se realiza un segundo filtrado basándose en los datos de intensidad normalizados. En concreto, se eliminan aquellas secuencias que no hubiesen disminuido o aumentado la expresión en 1,6 veces. Estos son valores utilizados como límite de cambio de expresión entre condiciones y permiten eliminar secuencias que no varían en ninguna muestra del experimento y por lo tanto no son informativas.

Las diferencias existentes entre cada una de las condiciones así como la variabilidad dentro de cada condición se comprueban con la elaboración de un clúster o árbol jerárquico no supervisado (los genes no son el resultado de la aplicación de un test estadístico). Para llevar a cabo este procedimiento se calculó la correlación de cada gen con todos los demás, y se agruparon los dos genes que presentaban la correlación más alta. A continuación se calculó la media del perfil de expresión de esos dos genes y con ese gen “sintético” se repite el cálculo de la correlación para todos los demás genes. Proceso que se repite hasta que todos los genes han sido agrupados por parejas. Posteriormente, se calcularon los ratios de separación y la medida de similitud que organizarán el árbol formando grupos discretos y ramificaciones, respectivamente. El clúster jerárquico realizado en el presente estudio se ha efectuado utilizando el software GeneSpring GX, aplicando como medida de distancia la correlación Pearson. Además, se realizaron dos agrupaciones no supervisadas separando las muestras tomadas al INICIO del tratamiento y las muestras tomadas al FINAL del tratamiento.

Para la identificación de cambios en expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se han realizado varios análisis en función de la comparación estudiada (test paramétrico ANOVA para las comparaciones de 3 o más grupos ó t de Student para muestras pareadas) utilizando el software GeneSpring GX 7.3 (Agilent). La aplicación del test estadístico para muestras pareadas lleva implícita una normalización específica para muestras de estas características. Un test pareado utiliza el valor medio de las diferencias entre los pares de muestras apareadas para detectar diferencias significativas. Se han realizado las comparaciones HT Final *vs* Inicio, DMBA Final *vs* Inicio y ADR Final *vs* Inicio, tomando como valor significativo aquellas secuencias con un valor de $P < 0.05$. Un valor de FC por encima de 1 indica sobreexpresión respecto de la línea base mientras que valores por debajo de 1 indican represión.

Por último, para comprobar que las secuencias seleccionadas y comparadas diferencian las condiciones INICIO y FINAL, se realizó un clúster supervisado utilizando los valores de intensidad normalizada y seleccionando la correlación Pearson como la medida de distancia.

II.4.3.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA VALIDACIÓN MEDIANTE RTPCR.

Para tratar de encontrar diferencias significativas en la expresión de los genes seleccionados a partir de experimentos de PCR cuantitativa se siguieron los siguientes pasos:

- a) Filtrado y procesamiento.
- b) Normalización global de las placas para la obtención de la lista de trabajo.
- c) Aplicación de herramientas bioinformáticas para detectar diferencias en la expresión génica.

Como primer paso del análisis se hizo un filtrado en el que aquellos valores de C_T presenten una desviación estándar entre réplicas de la misma sonda de PCR mayor a lo esperado entre las réplicas o un valor nulo fueron descartadas. A continuación, para calcular los valores de expresión de cada gen se aplicó la fórmula $2^{\exp(C_{T_{\min}} - C_{T_{\text{sample}}})}$, donde $C_{T_{\min}}$ es el valor mínimo de C_T de cada gen en todas las muestras, y $C_{T_{\text{sample}}}$ es el valor de C_T de ese gen en esa muestra.

Para la normalización de los datos se calculó el factor de normalización de cada muestra, tomando los valores de expresión de los 6 *housekeeping* o controles internos seleccionados, mediante el programa *geNorm* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) que calcula la media geométrica del valor de expresión del total de genes *housekeeping*. Una vez obtenido el factor de normalización de cada muestra se normalizaron los datos de cada gen en cada muestra respecto a este factor de normalización obtenido para dicha muestra del programa *geNorm*. Para la obtención de los valores de expresión de cada uno de los genes los datos de las dos condiciones experimentales que se comparan están normalizadas frente a la media de los genes pertenecientes a la línea base considerada en cada caso. Un valor de expresión por encima de 1 indica sobreexpresión respecto de la línea base mientras que valores por debajo de 1 indican represión.

Con el propósito de reducir al máximo el alto número de datos de expresión génica obtenidos perdiendo la menor cantidad de información posible, y representarlos en un espacio reducido para analizarlos visualmente, se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA), de tal forma que sea posible percibir relaciones que de otra manera permanecerían ocultas en dimensiones superiores. La imagen resultante se compara con los factores experimentales conocidos con el fin de asociar la variabilidad observada (o lo que es lo mismo, diferencias) a alguno de ellos.

Para comprobar si los perfiles de expresión se agrupan en conjuntos o clústers por similitud entre ellos, se realizó un clúster jerárquico no supervisado (los genes no son el resultado de la aplicación de un test estadístico) utilizando el software Partek Genomics Suite, aplicando como medida de similitud la distancia euclídea y como método de agrupación el método de “Average linkage”.

Para la identificación de cambios en expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizaron varios análisis en función de la comparación estudiada (test paramétrico ANOVA para las comparaciones de 3 o más grupos ó t de Student para muestras pareadas). Aquellos genes con valores de $P < 0.05$ en la comparación realizada presentan diferencias de expresión estadísticamente significativas. Cuanto menor es el valor de P , más significativa es la diferencia de expresión entre las condiciones a efectos estadísticos.

Por último se realizó un análisis PCA y clúster jerárquico comparando los diferentes grupos de estudio entre sí en los momentos INICIO y FINAL del tratamiento, con el fin de comprobar que estas secuencias seleccionadas se agruparon conforme a su condición en los momentos nombrados.



Resultados

I.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS.

Todos aquellos parámetros analíticos relacionados con la bioquímica del plasma que han sido estudiados en el presente trabajo se recogen en la **Tabla 1**. Se observa que no hay diferencias estadísticas con significación alguna entre los grupos CONTROL, DMBA, HT, ADR y ADR+HT para ninguno de los parámetros determinados, exceptuando aquellos relacionados con el perfil lipídico. Tanto los lípidos totales, como triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL) y colesterol (CO) presentaron mayor concentración en los grupos ADR y ADR+HT. Sin embargo, no se encontraron divergencias con significación estadística entre estas dos agrupaciones, pero sí que el grupo ADR era significativamente distinto con respecto a los animales HT, DMBA y CONTROL para los cuatro parámetros lipídicos. No ocurrió lo mismo para ADR+HT, que aunque presentó valores superiores de lípidos totales, TG, PL y CO solamente fueron significativos los de TG cuando se compararon con los grupos exentos de adriamicina y aquellos controles sanos.

Tabla 1. Parámetros bioquímicos en plasma de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con doxorubicina y/o hidroxitirosol.

Parámetros	CONTROL	DMBA	HT	ADR	ADR+HT
Glucosa (mg/dl)	165± 12	184± 20	204± 15	251±31	302±52
Proteína Total (g/dl)	5.1± 0.2	4.4± 0.4	4.3± 0.3	8.7± 2.6	18.0± 6.7
Lactato (mg/dl)	38.3± 4.3	33.9± 4.1	29.4± 4.2	45.7± 8.0	63.7± 18
CK (U/L)	267± 86	103± 17	64±19	164± 45	151± 77
LDH (U/L)	501± 105	376± 66	323± 68	304± 33	327± 91
ALP (U/L)	48.3± 12	57.2± 16	37.0± 16	28.1± 4.4	21.0± 9.1
GPT (U/L)	12.1± 2.1	21.9± 8.5	10.7± 3.5	11.3± 3.9	15.0± 3.8
GOT (U/L)	19.9± 2.2	33.6± 8.9	18.9± 2.8	14.9± 2.7	17.7± 2.9
Lípidos Totales (mg/dl)	234± 51 ^a	217± 33 ^a	278±44 ^a	1249± 218 ^b	1480± 325 ^{ab}
TG (mg/dl)	64± 13 ^a	65± 9 ^a	69± 8 ^a	450± 100 ^b	676± 169 ^b
PL (mg/dl)	142± 9 ^a	106± 10 ^a	112± 4 ^a	279± 27 ^b	467± 144 ^{ab}
CO (mg/dl)	91± 6.8 ^a	70± 8.3 ^a	78± 4.7 ^a	290± 43 ^b	462± 138 ^{ab}

Los valores se expresan como media ± eem. CONTROL: grupo control sano sin cáncer de mama, DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Valores con diferente letra en la misma fila son estadísticamente significativos entre tratamientos, $P < 0.05$.

II.- PARÁMETROS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.

II.1.- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICA.

No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales para este parámetro, como queda reflejado en la *Figura 1*.

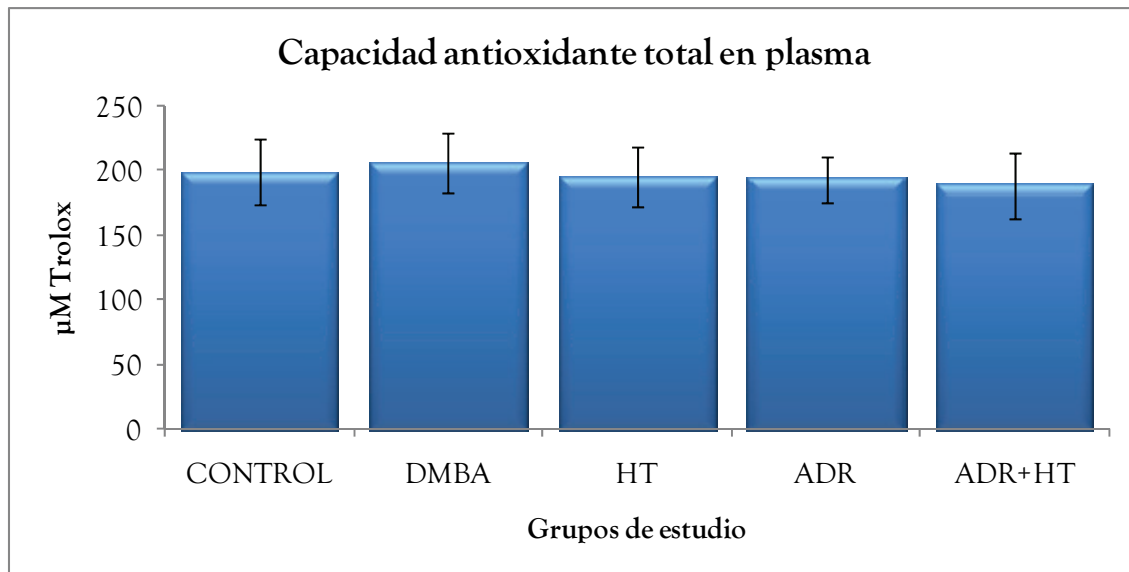


Figura 1. Capacidad antioxidante total en plasma. Los valores se expresan como media \pm eem. CONTROL: grupo control sano sin cáncer de mama, DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol.

II.2.- DETERMINACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD.

El ensayo comet para determinar el daño oxidativo a nivel de ADN realizado en linfocitos de sangre periférica, expresado como % de ADN en la cola de los cometas visualizados, reveló que el grupo control sano fue el menos dañado. Además, éste fue estadísticamente significativo cuando se compara con el resto de agrupaciones con cáncer de mama, no existiendo entre estas últimas significación alguna. No obstante, se observó una tendencia a la baja en aquellos grupos en los que el HT estaba presente (*Figura 2*).

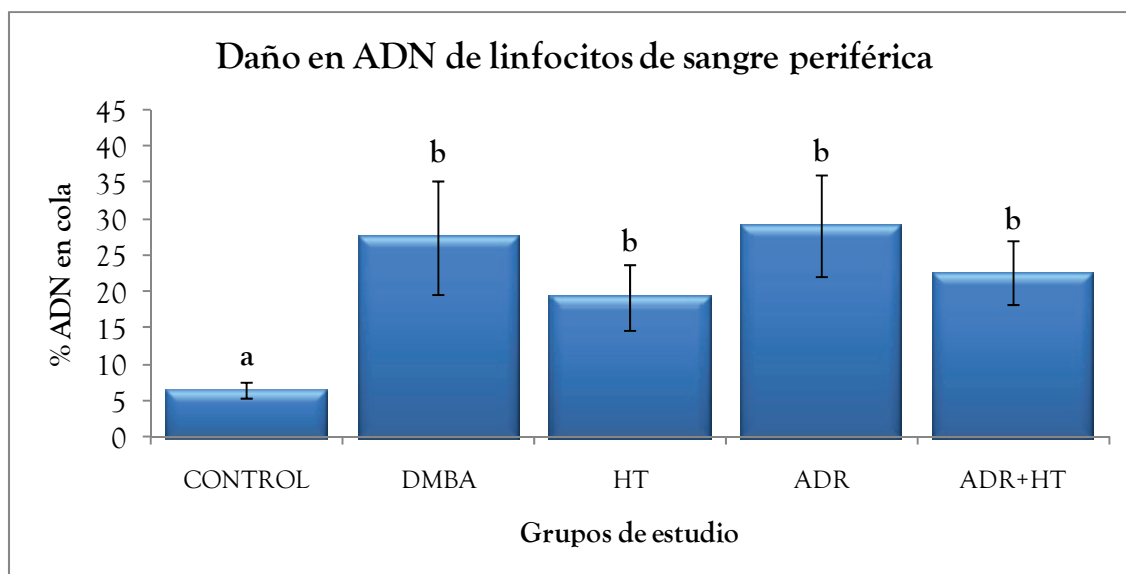


Figura 2. Daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica. Los valores se expresan como media \pm eem. CONTROL: grupo control sano sin cáncer de mama, DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, $P < 0.05$.

II.3.- ANTIOXIDANTES PLASMÁTICOS.

Los valores de los compuestos antioxidantes determinados en plasma quedan recogidos en la **Tabla 2**. En relación al retinol, no se hallaron diferencias entre los grupos. Se observa que el tocoferol expresado en μM está aumentado de forma significativa en los grupos ADR y ADR+HT con respecto al resto de grupos, que no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando este parámetro se expresa en función de los lípidos circulantes la situación cambia. Así pues, el grupo HT presentó los niveles más bajos aunque no fueron estadísticamente significativos al ser comparados con los grupos CONTROL, DMBA y ADR+HT. Esto no ocurre cuando se compara con ADR, que aunque presenta los mayores niveles no son estadísticamente significativos con respecto a CONTROL, DMBA y ADR+HT.

Tabla 2. Antioxidantes en plasma de ratas con cáncer de mama experimental con adriamicina y/o hidroxitirosol.

	CONTROL	DMBA	HT	ADR	ADR+HT
Retinol (μM)	3.4 \pm 0.1	15.1 \pm 3.2	7.2 \pm 1.6	12.3 \pm 3.3	9.2 \pm 2.1
Retinol (pmoles/mg lípidos)	1.5 \pm 0.4	5.4 \pm 1.3	3.3 \pm 0.9	1.1 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2
Tocoferol (μM)	12.7 \pm 0.8 ^a	9.7 \pm 1.4 ^a	9.1 \pm 0.8 ^a	92.3 \pm 17 ^b	95.0 \pm 27 ^b
Tocoferol (pmoles/mg lípidos)	5.6 \pm 0.5 ^{ab}	5.3 \pm 0.6 ^{ab}	3.9 \pm 0.6 ^a	7.6 \pm 0.7 ^b	6.3 \pm 0.5 ^{ab}
Coenzima Q ₉ (μM)	0.14 \pm 0.02 ^a	0.19 \pm 0.03 ^a	0.20 \pm 0.02 ^a	0.51 \pm 0.06 ^b	0.58 \pm 0.11 ^b
Coenzima Q ₉ (pmoles/mg lípidos)	0.08 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	0.092 \pm 0.01	0.05 \pm 0.006	0.063 \pm 0.01
Coenzima Q ₁₀ (μM)	0.042 \pm 0.004	0.042 \pm 0.004	0.047 \pm 0.003	0.056 \pm 0.009	0.092 \pm 0.02
Coenzima Q ₁₀ (pmoles/mg lípidos)	0.02 \pm 0.003 ^b	0.03 \pm 0.006 ^b	0.02 \pm 0.003 ^b	0.006 \pm 0.002 ^a	0.009 \pm 0.002 ^{ab}
Coenzima Q total (μM)	0.18 \pm 0.02 ^a	0.23 \pm 0.03 ^a	0.25 \pm 0.02 ^a	0.57 \pm 0.06 ^b	0.67 \pm 0.12 ^{ab}
Coenzima Q total (pmoles/mg lípidos)	0.08 \pm 0.01 ^b	0.14 \pm 0.02 ^b	0.11 \pm 0.02 ^b	0.05 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.01 ^a

Los valores se expresan como media \pm eem. CONTROL: grupo control sano sin cáncer de mama, DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, $p < 0.05$.

En cuanto al coenzima Q₉, el grupo CONTROL es el que presentó la menor cantidad, aunque no mostró significación estadística con respecto a los grupos HT y DMBA. A diferencia de lo que sucede con aquellos animales tratados con la antraciclina, sola o en combinación con el antioxidante, los cuales mostraron niveles significativamente más elevados que los tres grupos anteriores, pero sin diferencias entre ellos dos. Estas diferencias se pierden al expresar el coenzima Q₉ en función del contenido en lípidos del plasma.

Los niveles encontrados de coenzima Q₁₀ fueron muy bajos para todos los grupos experimentales. No se observa significación estadística alguna para los distintos valores encontrados entre las agrupaciones estudiadas cuando se expresa en μM . Si se expresa en función de los lípidos se comprueba como el grupo ADR es el que presentó menor cantidad de este coenzima que es significativa con respecto a CONTROL, HT y DMBA, no así cuando se comparó con ADR+HT. Los niveles de este último también son bajos pero sin ser significativamente distintos a CONTROL, HT y DMBA, cuyos niveles no mostraban diferencias significativas.

Esta situación encontrada para el coenzima Q₁₀ expresado en función de los lípidos es la misma que se observa al estudiar los niveles totales de coenzima Q. La única diferencia radica en que los grupos CONTROL, HT y DMBA presentaron menor cantidad total. En concreto, el grupo sano sin cáncer es el que mostró los niveles más bajos, al contrario de lo que sucedió con ADR y ADR+HT que presentaron más coenzima Q total. La situación anterior cambia radicalmente al expresar los niveles de coenzima Q total parámetro en función de los lípidos totales. En este caso, los grupos ADR y ADR+HT mostraron menor cantidad y dentro de éstos el primero contiene los niveles más bajos, aunque no son estadísticamente significativos con respecto a ADR+HT. Por último, los grupos CONTROL, HT y DMBA tuvieron mayor cantidad total de coenzima Q.

III.- NIVELES PLASMÁTICOS DE HIDROXITIRO SOL Y ALCOHOL HOMOVANÍLICO.

Como queda reflejado en la *Figura 3* el hidroxitiro sol fue el compuesto hallado de forma mayoritaria, seguido de alcohol homovanílico. El grupo HT es el que más cantidad de hidroxitiro sol conservó, siendo significativa con respecto a ADR+HT. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los de tratamiento en relación al alcohol homovanílico.

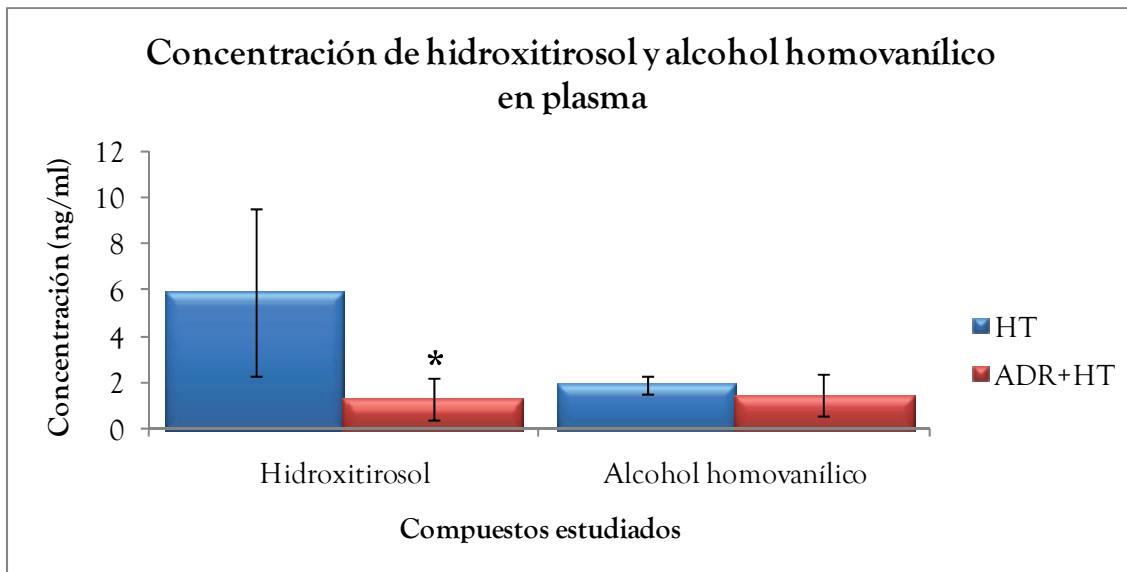


Figura 3. Concentración de hidroxitirosol y alcohol homovanílico en plasma. Los valores se expresan como media \pm eem. HT: hidroxitirosol, ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Los símbolos indican diferencias significativas entre grupos de tratamiento para el compuesto estudiado (* $P < 0.05$).

IV.- PARÁMETROS TUMORALES Y PESOS DE LOS ANIMALES.

Los pesos de los animales de experimentación (*Figura 4*) en el momento de inicio de los tratamientos (Basal) fueron muy similares entre los diferentes grupos, de tal manera que no se han encontrado diferencias significativas entre ellos. Al momento del sacrificio (Final) el peso de los animales del grupo DMBA fue significativamente mayor con respecto a ADR y ADR+HT. Los dos únicos grupos que presentaron un mayor peso corporal al sacrificio fueron DMBA y HT.

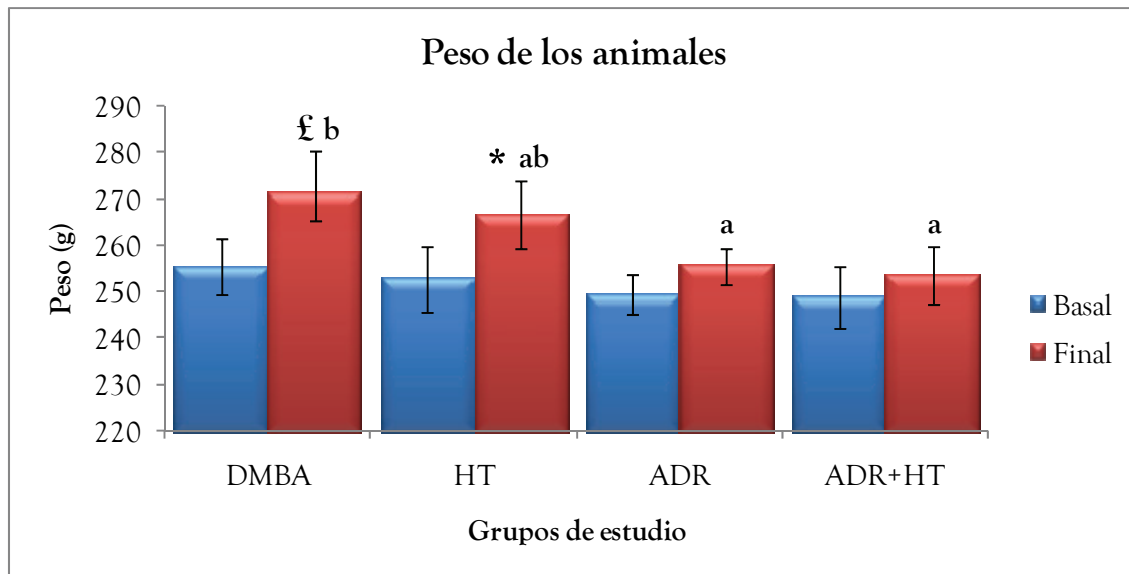


Figura 4. Peso de los animales. Los valores se expresan como media \pm eem. DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Para cada momento experimental (basal y final), barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, $P < 0.05$. Los símbolos indican diferencias significativas entre momento Basal y Final dentro de un mismo grupo de tratamiento (* $P < 0.05$; £ $P < 0.01$).

El modelo de carcinogénesis mamaria inducida con DMBA muestra que todos los animales con cáncer en el momento basal presentaron valores de multiplicidad tumoral similares entre grupos (*Figura 5*). La misma descripción sirve para los resultados de multiplicidad final, aunque éstos sean superiores a los basales. Los grupos ADR y DMBA son los únicos que mostraron valores significativamente mayores cuando se compara el momento basal y final.

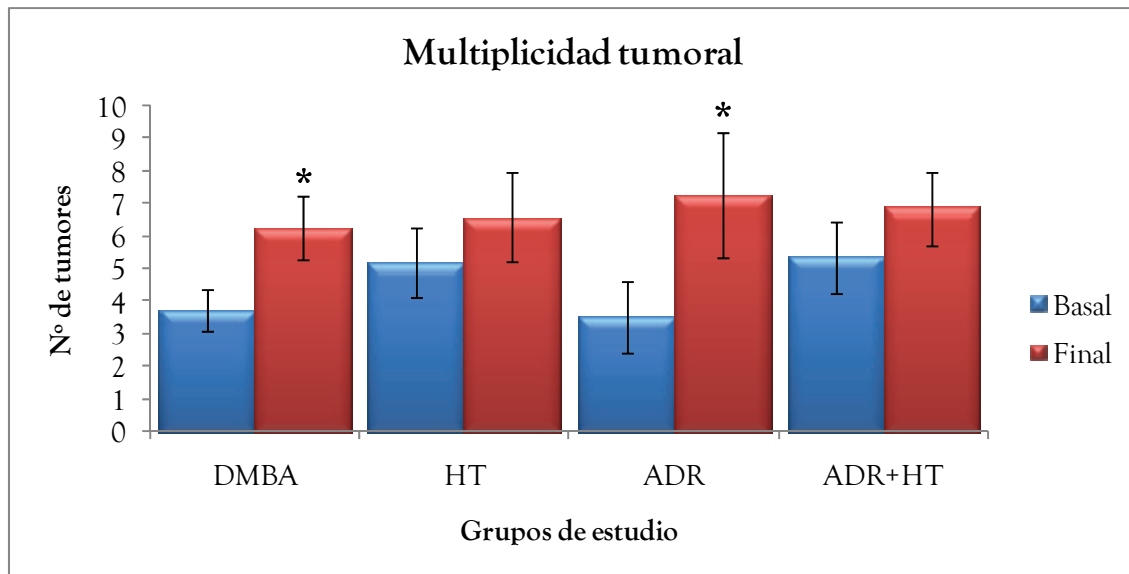


Figura 5. Multiplicidad tumoral. Los valores se expresan como media \pm eem. DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Los símbolos indican diferencias significativas entre momento Basal y Final dentro de un mismo grupo de tratamiento (* $P < 0.05$).

Como ya se ha explicado, el estudio que se muestra en la presente memoria de tesis doctoral se caracteriza, entre otros, porque de forma aleatoria se seleccionó un tumor cuya evolución fue seguida y comparada con su momento pretratamiento (tumor trucut). Es importante anotar que para todos los grupos de experimentación con cáncer de mama, el volumen de partida (Basal) del tumor trucut fue prácticamente el mismo (2cm^3), de hecho, no hubo diferencias significativas entre grupos con respecto a este parámetro (**Figura 6**). Sin embargo, la situación cambia una vez finalizado el estudio. Se observa como el volumen del tumor biopsiado aumentó significativamente en el grupo control DMBA respecto al resto de grupos tratados, de entre los cuales, aquellos que contienen en la terapia la antraciclina son los que menos incrementaron su tamaño. El antioxidante *per se* ha logrado mantener el volumen de este tumor en unos niveles inferiores estadísticamente significativos con respecto al grupo DMBA, aunque el volumen del tumor trucut al final fue superior al obtenido para ADR y ADR+HT. No se observa que la combinación de adriamicina e hidroxitirosol sea inefectiva, ya que aunque el volumen sea ligeramente superior para ADR+HT, éste no es estadísticamente significativo con

respecto a ADR. Por último, los grupos HT y DMBA mostraron diferencias significativas en la comparación basal *vs* final.

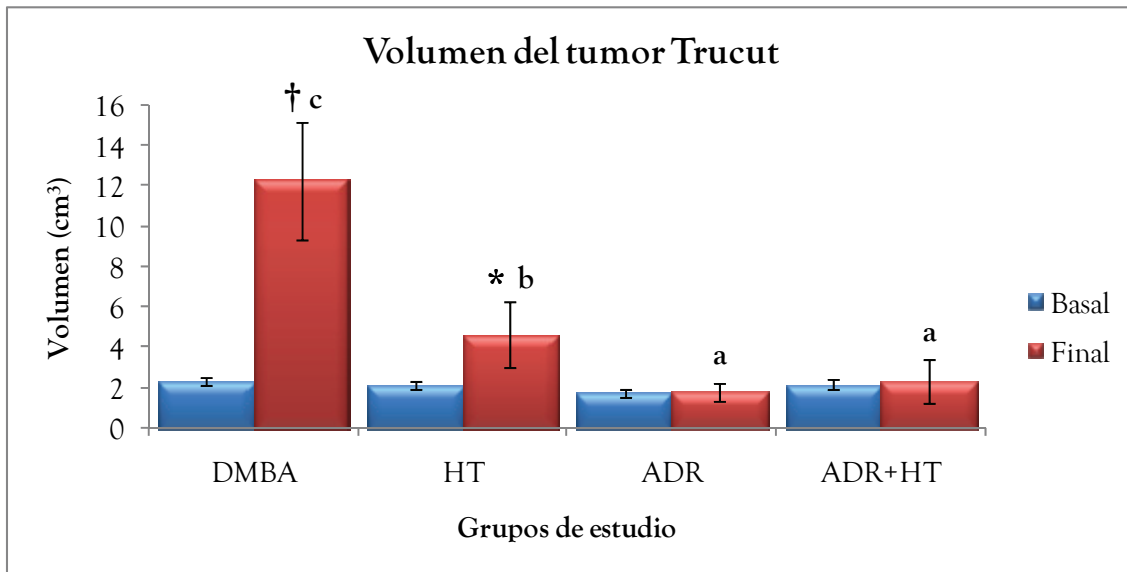


Figura 6. Volumen del tumor trucut. Los valores se expresan como media \pm eem. DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, $P < 0.05$. Los símbolos indican diferencias significativas entre momento Basal y Final dentro de un mismo grupo de tratamiento (* $P < 0.05$; † $P < 0.001$).

Por otro lado, el volumen tumoral total (**Figura 7**) muestra que aquellos grupos sometidos a tratamiento (HT, ADR, y ADR+HT) presentaron un menor volumen estadísticamente significativo en comparación con el no tratado (DMBA), pero no entre ellos. Las medidas tumorales antes de iniciarse el tratamiento no presentaron variaciones significativas. Respecto a la comparación intragrupos basal *vs* final, tanto el grupo control DMBA como HT y ADR presentaron diferencias estadísticamente significativas, no así para ADR+HT.

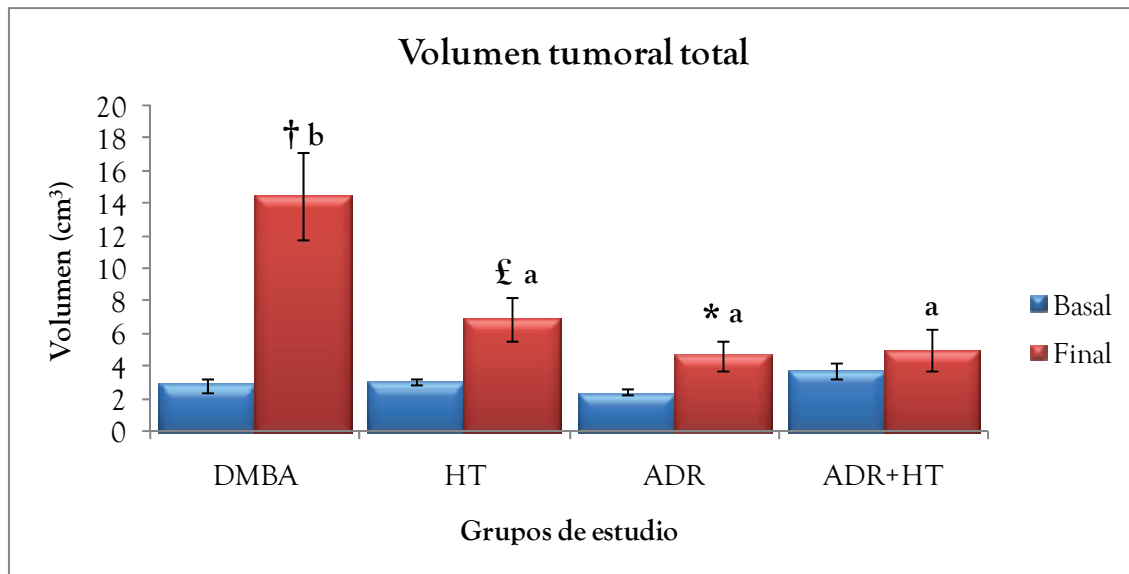


Figura 7. Volumen tumoral total. Los valores se expresan como media \pm eem. DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Para cada momento experimental (basal y final), barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, $P < 0.05$. Los símbolos indican diferencias significativas entre momento Basal y Final dentro de un mismo grupo de tratamiento (* $P < 0.05$; £ $P < 0.01$; † $P < 0.001$).

V.- ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LOS TUMORES. ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI67).

El estudio anatomopatológico de las muestras tumorales constó del análisis del patrón arquitectural y atipia nuclear. En la *Tabla 3* se observan estos parámetros, mostrando que no hubo diferencias significativas para ninguno de éstos entre los grupos de estudio. Sin embargo, cuando se compara dentro de cada grupo entre el momento basal y el final, se observaron diferencias significativas en el grupo DMBA para el patrón arquitectural. En el resto no hubo variaciones significativas.

En cuanto a la atipia nuclear, aumentó en todos los grupos con respecto al momento basal, pero no fue significativa en ningún caso.

Tabla 3. Estudio anatomopatológico de los tumores de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con doxorubicina y/o hidroxitirosol.

	DMBA		HT		ADR		ADR+HT	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
Patrón Arquitectural	1.1±0.1	1.78±0.2*	1.11±0.1	1.7±0.2	1.14±0.1	1.5±0.2	1.12±0.1	1.25±0.2
Atipia	1.22±0.1	1.78±0.2	1.1±0.1	1.3±0.2	1.00±0.0	1.3±0.2	1.12±0.1	1.6±0.2

Los valores se expresan como media ± eem. DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. El asterisco indica diferencia significativa (test de Wilcoxon) entre el estado inicial y final (* P<0.05).

El análisis porcentual del Grado de Bloom-Richardson (*Tabla 4*) indica que en los tumores trucut de todos los grupos al inicio predominó el grado I. Como cabía esperar, el grupo con cáncer no tratado progresó en mayor medida hacia el grado II y fue el único que se malignizó aún más hacia el III. Por su parte, de los grupos tratados, el de ADR es el que más permitió la progresión hacia el grado II, seguido del grupo HT (aunque éste ya parte desde el momento basal con 10% de casos grado II) y ADR+HT. Si estas tres agrupaciones experimentales hubiesen partido de mismo punto basal (100% grado I), el HT sería el que menos habría progresado a grado II. Por último, indicar que en ninguno de estos tres grupos tratados se progresó hasta el grado superior de malignidad (grado III).

Tabla 4. Grado de Bloom-Richardson del tumor Trucut de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con adriamicina y/o hidroxitirosol.

GRADO	DMBA		HT		ADR		ADR+HT	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
I	90	22	90	60	100	50	100	63
II	10	67	10	40	0	50	0	37
III	0	11	0	0	0	0	0	0

Los valores se expresan como porcentaje. HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol.

Por último, la clasificación morfológica de los tumores trucut (*Tabla 5*) indica que la histología predominante tanto en el momento basal como final fue la cribiforme. Si bien, en el estadio basal sólo el grupo HT presentó mayor variación al mostrar algunos de tipo mixto y papilar, ya que el resto de grupos partieron todos del 100% cribiforme. Diferente lectura es la que hay con respecto al momento final, ya que todos modificaron la

morfología siendo aún el predominante el cribiforme seguido del mixto y papilar. Es curioso como el grupo ADR+HT modificó en mayor proporción la morfología hacia mixto y papilar. Además, merece la pena observar como el grupo HT solamente ha cambiado un 20% de cribiformes hasta mixtos y ha permanecido invariable el 10% de papilares. Esto se asemeja a la variación experimentada por el grupo ADR, que sólo ha transferido un 11% al estado mixto. El DMBA es el único que alcanzó al final un porcentaje de muestras con otro tipo de patrón.

Tabla 5. Clasificación morfológica del tumor Trucut de ratas con cáncer de mama experimental tratadas con doxorubicina y/o hidroxitirosol.

MORFOLOGIA	DMBA		HT		ADR		ADR+HT	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
Cribiforme	100	67	80	60	100	89	100	50
Mixto	0	22	10	30	0	11	0	37
Papilar	0	0	10	10	0	0	0	13
Otros	0	11	0	0	0	0	0	0

Cribiforme (>70% de este patrón).

Mixto (30-70% del patrón cribiforme y el resto del papilar).

Papilar (< 30% de patrón cribiforme).

Otros: Sólido, tubular, no especificado.

Los valores se expresan como porcentaje. HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol.

La **Figura 8** se corresponde con las imágenes obtenidas tras la tinción con hematoxilina-eosina con patrón cribiforme (10X) (**A**), papilar (10X) (**B**) y sólido (40X) (**C**).

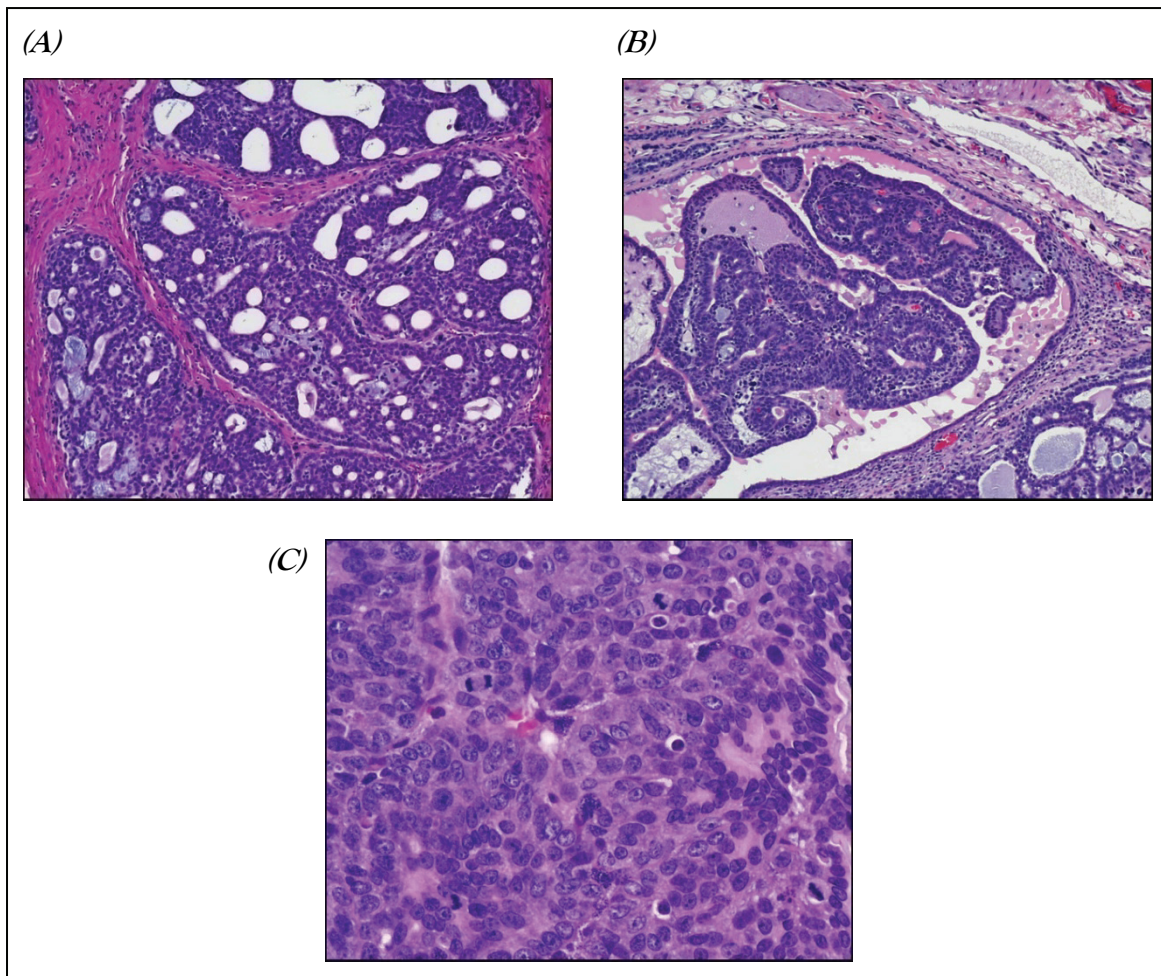


Figura 8. Morfologías cribiforme (A), papilar (B) y sólido (C), vistas a 10, 10 y 40 aumentos, respectivamente. Tinción de hematoxilina-eosina.

El estudio inmunohistoquímico para la evaluación de la proliferación de las células tumorales mediante la detección de Ki67 se representa en la **Figura 9**. Ésta revela que los grupos HT, ADR y ADR+HT presentaron una proliferación celular significativamente inferior a la del grupo de cáncer de mama no tratado (DMBA). Las diferencias entre los tres grupos tratados no fueron estadísticamente significativas.

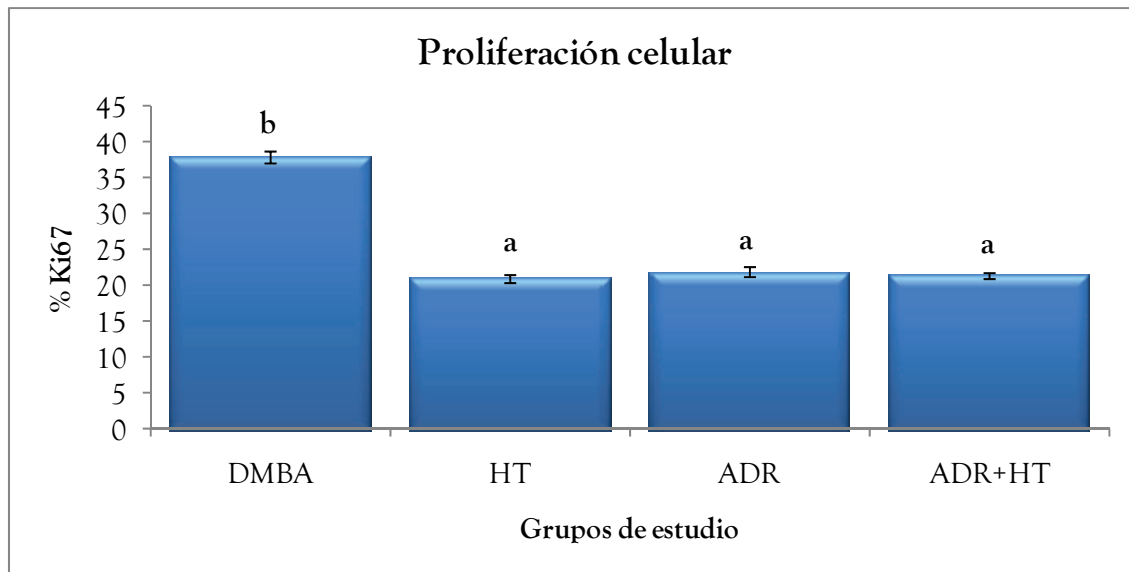


Figura 9. Proliferación celular. Los valores se expresan como media \pm eem. DMBA: grupo control de cáncer de mama, HT: grupo tratado con hidroxitirosol, ADR: grupo tratado con adriamicina, y ADR+HT: grupo tratado con adriamicina e hidroxitirosol. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, $P < 0.05$.

La **Figura 10** se corresponde con la inmunotinción para Ki67 a 40 aumentos, reflejado por la tinción nuclear de color marrón. La imagen (A) presenta un alto índice proliferativo, mientras que la imagen (B) muestra un índice proliferativo medio.

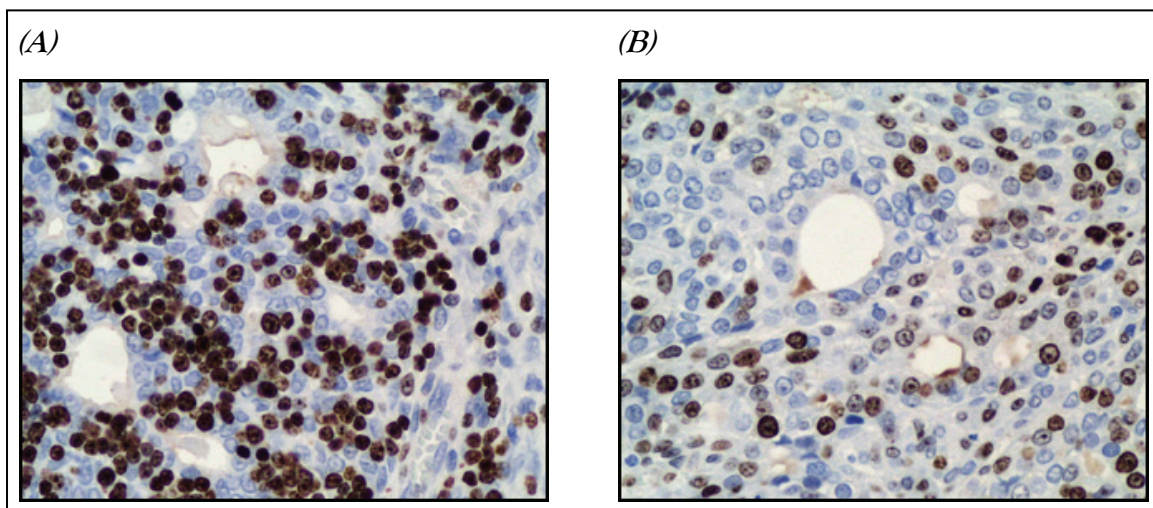


Figura 10. Inmunotinción para Ki67 (40X). Intensa tinción nuclear (marrón) de las células neoplásicas. (A) Área de alto índice proliferativo. (B) Área de índice proliferativo medio.

VI.- PERFIL GENÉTICO MEDIANTE MICROARRAY.

En este apartado se van a tratar los siguientes puntos:

- 1) Concentración y pureza del ARN y ARNc obtenidos. Control de calidad de la hibridación.
- 2) Análisis bioinformático de los arrays.
- 3) Análisis funcional de las secuencias significativas:
 - Grupo HT.
 - Grupo DMBA.
 - Grupo ADR.
- 4) Genes seleccionados para su validación por RTPCR.

VI.1.- CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ARN Y ARNc OBTENIDOS. CONTROL DE CALIDAD DE LA HIBRIDACIÓN.

Para la elaboración del microarray es imprescindible la obtención de suficiente cantidad de ARN de las muestras tumorales, así como la correcta pureza del mismo determinada espectrofotométricamente a una absorbancia de 260/280nm. Esta premisa es exactamente igual para el ARNc que se sintetiza a partir del ARN de origen. En este estudio genético se obtuvo suficiente cantidad tanto de ARN como de ARNc, presentando ambos unos niveles adecuados de pureza, como queda reflejado en las *Tablas 6 y 7*.

Tabla 6. Medida de la concentración y pureza del ARN extraído.

Muestra	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pureza ($A_{260/280}$)	μg totales	Muestra	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pureza ($A_{260/280}$)	μg totales
07SE115	0.570	2.13	17.1	07SE130	0.967	2.10	29.01
07SE116	0.880	2.18	26.4	07SE131	1.018	2.11	30.54
07SE117	0.580	2.13	17.4	07SE132	0.335	2.08	10.05
07SE118	0.836	2.14	25.08	07SE133	1.453	2.13	43.59
07SE119	0.482	2.01	14.46	07SE134	1.434	2.11	43.02
07SE120	0.803	2.15	24.09	07SE135	1.323	2.12	39.69
07SE121	0.410	2.12	12.3	07SE136	0.665	2.17	19.95
07SE122	0.269	2.11	8.07	07SE137	1.590	2.15	47.7
07SE123	0.754	2.14	22.62	07SE138	0.981	2.07	29.43
07SE124	0.500	2.07	15	07SE139	0.843	2.14	25.29
07SE125	0.239	2.10	7.17	07SE140	0.132	2.04	3.96
07SE126	0.317	2.09	9.51	07SE141	1.256	2.12	37.68
07SE127	0.165	2.10	4.95	07SE142	1.149	2.11	34.47
07SE128	0.417	2.18	12.51	07SE143	0.981	2.14	29.43
07SE129	0.489	2.07	14.67	07SE144	1.106	2.17	33.18

A. Absorbancia.

Tabla 7. Medida de la concentración y pureza de los ARNc sintetizados.

Muestra	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pureza ($A_{260/280}$)	μg totales	Muestra	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pureza ($A_{260/280}$)	μg totales
07SE115	5.496	2.04	91.4	07SE130	2.872	2.06	49.7
07SE116	4.699	2.05	82.6	07SE131	3.971	2.04	69.5
07SE117	4.705	2.01	78.0	07SE132	3.712	2.03	68.5
07SE118	5.779	2.04	102.0	07SE133	4.302	2.04	79.7
07SE119	5.102	2.04	84.7	07SE134	2.54	2.07	46.3
07SE120	5.388	2.03	95.0	07SE135	3.362	2.06	61.9
07SE121	4.298	2.06	75.4	07SE136	2.796	2.05	48.3
07SE122	4.715	2.07	82.9	07SE137	2.898	2.05	53.1
07SE123	3.557	2.03	62.0	07SE138	2.716	2.05	46.9
07SE124	3.449	2.08	60.1	07SE139	3.314	2.03	64.3
07SE125	5.1	2.06	89.8	07SE140	1.673	2.08	29.8
07SE126	4.596	2.05	80.7	07SE141	3.631	2.03	63.4
07SE127	5.04	2.04	88.7	07SE142	3.452	2.04	60.1
07SE128	4.17	2.07	77.2	07SE143	3.302	2.06	57.4
07SE129	4.028	2.04	66.5	07SE144	3.668	2.05	64.0

A. Absorbancia.

Para comprobar si los arrays hibridados superan los criterios de calidad establecidos, se representan en la **Tabla 8** los valores de cada uno de los chips para el spike control BioB y la relación 3'/5' para GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 8. Valores de los parámetros de calidad para cada uno de los chips analizados.

Código Muestra	BioB	GAPDH (3'/5')	FE (200)	Código Muestra	Spike control	GAPDH (3'/5')	FE (200)
07SE115	Presente	1.03	0.916	07SE129	Presente	1.09	1.096
07SE116	Presente	1.09	1.012	07SE130	Presente	1.21	1.124
07SE117	Presente	1.06	0.948	07SE131	Presente	1.09	0.959
07SE118	Presente	1.05	1.042	07SE132	Presente	1.12	0.916
07SE119	Presente	1.05	1.015	07SE133	Presente	1.06	1.260
07SE120	Presente	1.08	1.288	07SE134	Presente	1.08	1.199
07SE121	Presente	1.18	0.970	07SE135	Presente	1.18	1.092
07SE122	Presente	1.24	1.149	07SE136	Presente	1.15	1.014
07SE123	Presente	1.06	1.098	07SE137	Presente	1.11	0.857
07SE124	Presente	1.15	1.561	07SE138	Presente	1.14	1.264
07SE125	Presente	1.09	0.947	07SE139	Presente	1.13	1.175
07SE126	Presente	1.08	1.040	07SE140	Presente	2.51	2.057
07SE127	Presente	1.08	0.977	07SE141	Presente	1.06	0.971
07SE128	Presente	1.08	1.161	07SE142	Presente	1.08	0.910
07SE129	Presente	1.09	1.096	07SE143	Presente	1.03	1.256

BioB. Spike control seleccionado; GAPDH. Houskeeping seleccionado; FE. Factor de Escalado seleccionado de 200.

Todos los arrays hibridados superaron los criterios de calidad establecidos, ya que hay controles spike y relaciones 3'/5' de los genes housekeeping no superiores a 3. Además, el factor de escalado fue próximo entre los distintos arrays.

VI.2.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS ARRAYS.

Para comprobar el control de calidad de los arrays se hace el análisis de outlier, que consta de el valor % P call y el % Array outlier. La **Tabla 9** pone de manifiesto que todas las muestras presentan buena calidad ya que los valores de % P call son aceptables. Además, los bajos porcentajes que muestra el % Array outlier nos indica que los ARNc y los datos son de buena calidad y consistentes, exceptuando la muestra 07SE140 que sobrepasa el límite del 5%.

Tabla 9. Valores en porcentaje de los parámetros indicadores de la calidad de los datos en los arrays.

Muestra	% P call	% Array outlier	Muestra	% P call	% Array outlier
07SE115	65.1	0.466	07SE130	62.3	0.572
07SE116	63.8	0.1	07SE131	61.2	0.183
07SE117	61.9	0.424	07SE132	63.7	0.82
07SE118	65.4	0.135	07SE133	62.1	0.125
07SE119	65.9	0.318	07SE134	61.9	0.051
07SE120	60.0	0.817	07SE135	61.4	1.222
07SE121	64.4	0.135	07SE136	64.9	1.402
07SE122	63.9	0.122	07SE137	62.4	0.466
07SE123	63.9	0.103	07SE138	63.7	0.145
07SE124	61.0	0.068	07SE139	63.8	0.264
07SE125	62.9	1.196	07SE140	53.9	8.335
07SE126	62.9	0.315	07SE141	63.2	0.18
07SE127	62.3	1	07SE142	64.2	0.064
07SE128	64.3	0.244	07SE143	61.7	0.08
07SE129	64.4	0.177	07SE144	61.0	0.158

Estos resultados se suman a los valores de error estándar no escalados normalizados (valores NUSE) para cada set de sondas (*Figura 11*). Fueron adecuados en todas las muestras, indicando una buena consistencia de los arrays, excepto la muestra 07SE140 que se encuentra fuera del límite establecido 5-95%.

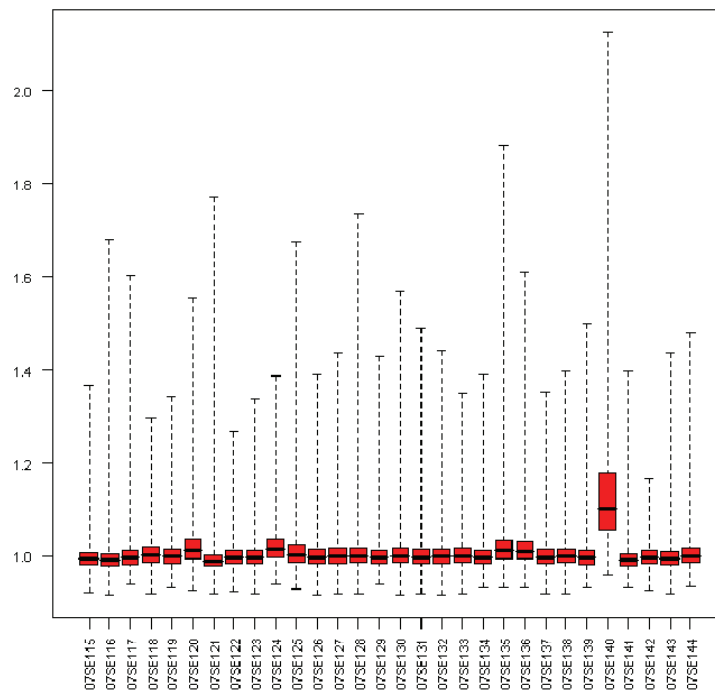


Figura 11. Gráfica NUSE representando el error estándar de cada sonda en cada chip.

Tras el preprocesamiento y primer filtrado de los resultados se obtuvo un número de secuencias para cada condición y tiempo recogidas en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Número de secuencias seleccionadas en cada condición y tiempo experimental.

TIEMPO	Condición	Nº secuencias Seleccionadas en cada condición	Nº secuencias seleccionadas en cada tiempo
INICIO	DMBA	13639	14154
	HT	13523	
	ADR	13491	
FINAL	DMBA	13441	14057
	HT	13541	
	ADR	13554	

Tras la normalización y segundo filtrado de las secuencias de la tabla anterior, se obtuvo la lista definitiva de secuencias que conforman las listas de trabajo GENERAL, INICIO y FINAL (*Tabla 11*).

Tabla 11. Número de secuencias de las listas de trabajo.

Lista de Trabajo	Nº secuencias seleccionadas
GENERAL	8214
INICIO	4444
FINAL	7127

Con el fin de comprobar si las secuencias correspondientes a la lista de trabajo GENERAL (8214 secuencias) se agruparon en conjuntos por condición experimental (por grupo: DMBA, HT, ADR; por tiempo: INICIO, FINAL). Se realizó un clúster jerárquico no supervisado (*Figura 12*) que mostró la ausencia de agrupación, y por tanto la presencia de variabilidad intragrupal.

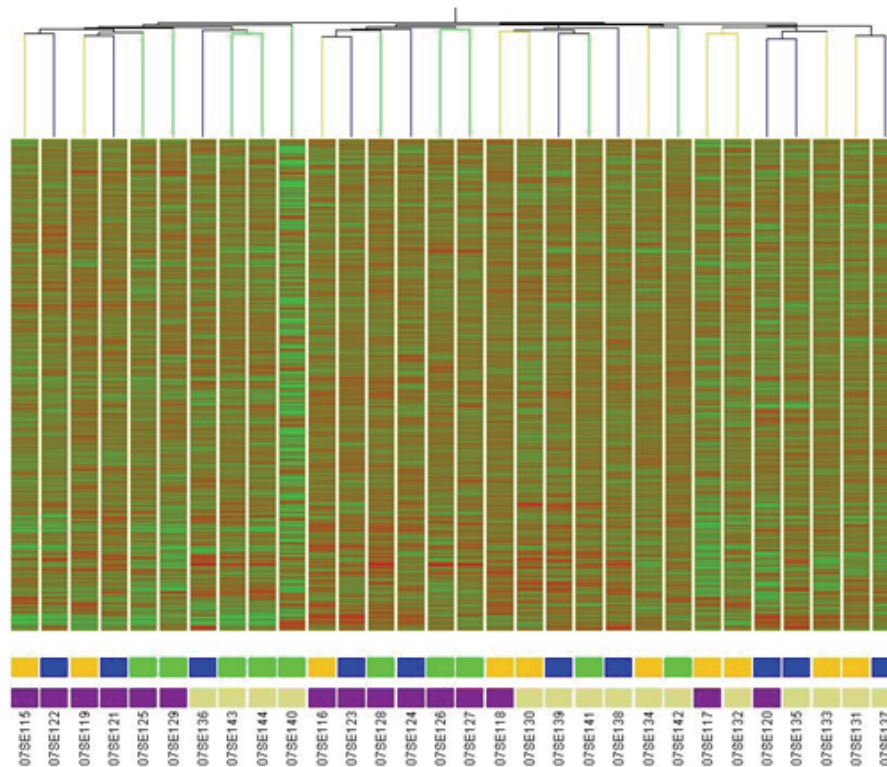


Figura 12. Clúster jerárquico bidimensional de muestras realizado a partir de la lista de trabajo GENERAL. Ensayo de microarray. Cada secuencia está representada por un color que oscila entre rojo y verde. Verde indica gen reprimido respecto a la mediana de todas las muestras, y rojo gen sobreexpresado. Sobre el nombre de la muestra se añaden dos códigos de color. Cada muestra está marcada en la fila superior por un color que representa la condición experimental (Amarillo: DMBA; Azul: HT; Verde claro: ADR. En la fila inferior, en morado se codifican las muestras tomadas al INICIO del tratamiento y en verde pálido las muestras tomadas al FINAL del tratamiento).

Del mismo modo se realizó otro clúster jerárquico no supervisado para las secuencias de las listas de trabajo INICIO (4444 secuencias) (A) y FINAL (7127 secuencias) (B) (**Figura 13**). Claramente se observa como en este caso las muestras tampoco tendieron a agruparse por condición de grupo experimental (DMBA, HT, ADR) dentro de sus correspondientes condiciones de tiempo (INICIO, FINAL). Este hecho muestra otra vez la variabilidad existente entre las muestras.

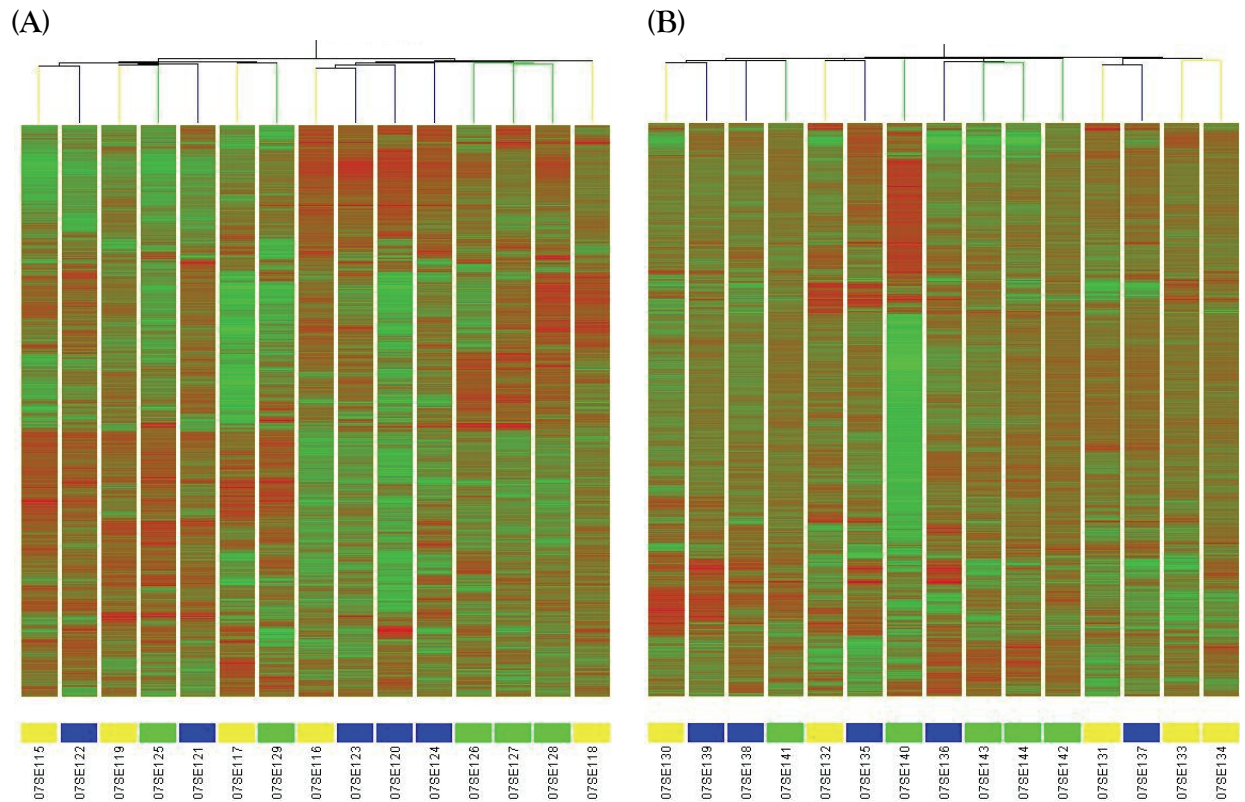


Figura 13. Clúster jerárquico bidimensional de muestras a tiempo INICIO (A) y FINAL (B) realizado a partir de las respectivas lista de trabajo (4444 y 7127 sondas respectivamente). Ensayo de microarray. Cada muestra está marcada por un color que representa la condición experimental (Amarillo: DMBA; Azul: HT; Verde claro: ADR).

Por último, el clúster jerárquico realizado sobre las secuencias de cada muestra procedentes de las comparaciones ADR *vs* HT *vs* DMBA Inicio (A) (88 secuencias) y ADR *vs* HT *vs* DMBA Final (B) (110 secuencias), indicó que en esta comparación las muestras sí representan adecuadamente la condición a la que pertenecen (INICIO, FINAL) (**Figura 14**).

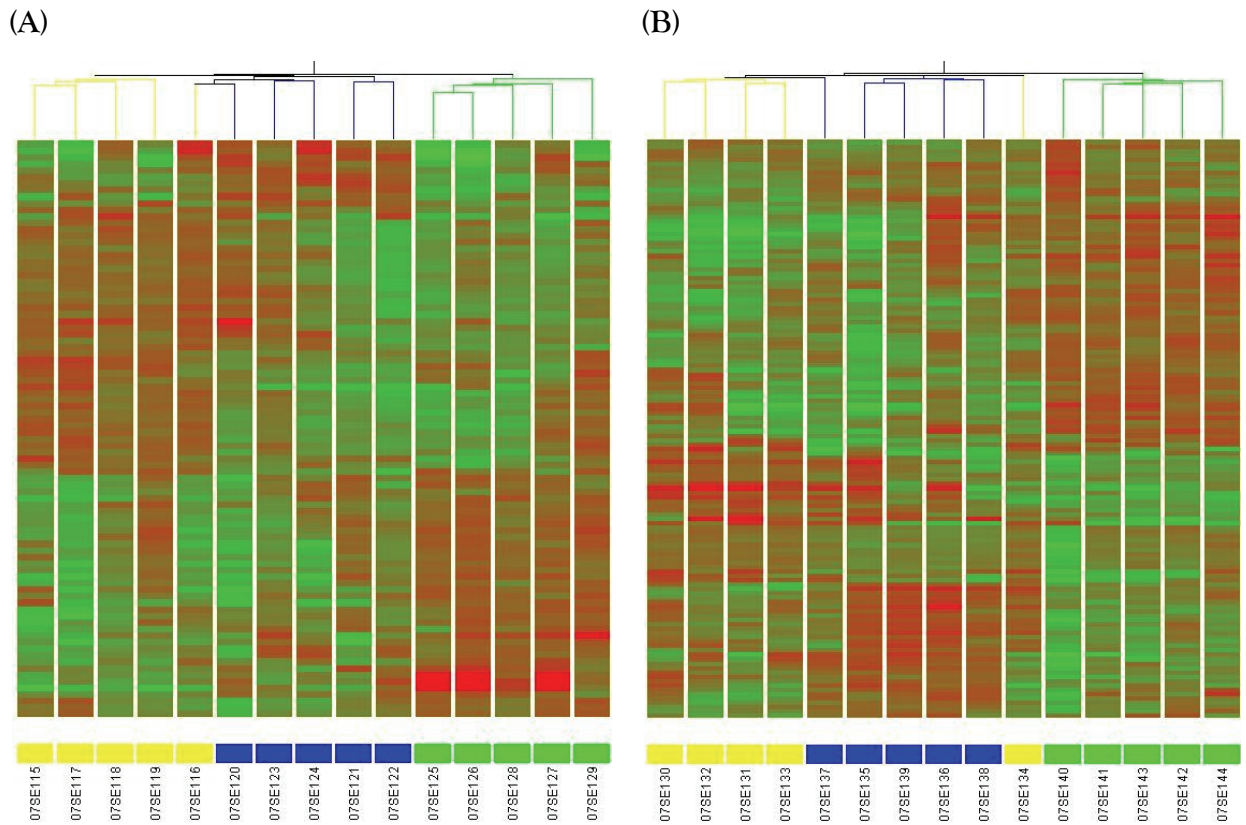


Figura 14. Clúster jerárquico bidimensional de muestras a tiempo INICIO (A) y FINAL (B) realizado a partir de las secuencias significativas (88 y 110 sondas respectivamente). Ensayo de microarray. Cada muestra está marcada por un color que representa la condición experimental (Amarillo: DMBA; Azul: HT; Verde claro: ADR).

VI.3.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS SECUENCIAS SIGNIFICATIVAS.

Las secuencias seleccionadas para el análisis funcional se corresponden con aquellas obtenidas tras la comparación Final *vs* Inicio, para cada grupo estudiado (HT, DMBA y ADR).

VI.3.1.- GRUPO HT.

Tras la eliminación de las secuencias no conocidas, predicciones, LOCUS, etc. de la lista de secuencias significativas del grupo HT (595), se obtuvo una lista reducida de 229 genes a la que se le realizó el análisis funcional. La herramienta DAVID clasifica los principales procesos biológicos (siguiendo el nivel 3 de Gene Ontology-GO-) en los que

están implicados los genes estudiados en función de lo significativa que sea la relación del gen con el proceso en cuestión ($P < 0.05$). Se puede comprobar que los genes seleccionados en el grupo HT están implicados en procesos importantes como la muerte celular y su regulación. Además de la diferenciación celular, procesos metabólicos de biomoléculas, como nucleótidos, ácidos nucleicos, lípidos, etc., (*Tabla 12*).

Tabla 12. Análisis funcional de los genes del grupo hidroxitirosol procedentes del microarray según su proceso biológico (DAVID).

<i>Proceso Biológico</i>	<i>Número Genes</i>	<i>% Genes</i>	<i>P<0.05</i>
Regulación de procesos celulares	64	28	0.0001
Biogénesis y organización de organelas	26	11	0.0006
Proceso metabólico de lípidos	20	9	0.0008
Respuesta a fármacos	8	4	0.0019
Biogénesis y organización de membranas	11	5	0.0029
Diferenciación celular	35	15	0.0031
Proceso metabólico de lípidos celulares	16	7	0.0044
Regulación negativa de procesos celulares	23	10	0.0068
Biogénesis y ensamblaje de complejos de ribonucleoproteínas	7	3	0.0094
Regulación de procesos metabólicos	37	16	0.0120
Muerte celular	18	8	0.0140
Transporte de lípidos	5	2	0.0140
Regulación negativa de procesos biológicos	23	10	0.0150
Transporte intracelular	17	7	0.0150
Regulación de procesos metabólicos celulares	35	15	0.0170
Proceso biosintético de lípidos	9	4	0.0180
Proceso metabólico de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	48	21	0.0190
Proceso metabólico de biomoléculas	63	27	0.0200
Regulación negativa de procesos metabólicos	11	5	0.0210
Regulación de la muerte celular programada	14	6	0.0260
Desarrollo de órganos	26	11	0.0270
Proceso metabólico del alcohol	10	4	0.0310
Regulación de expresión génica	32	14	0.0320
Transcripción ADN dependiente	29	13	0.0360
Transporte mediado por vesículas	12	5	0.0360
Lactancia	2	1	0.0390
Biogénesis y organización de estructuras extracelulares	5	2	0.0420

Un estudio detallado de algunos de los procesos usando la herramienta PANTHER, permite comprobar cómo hay importantes rutas que podrían estar siendo modificadas

por el hidroxitirosol (*Figura 15*). Así por ejemplo, hay genes implicados en la apoptosis como el receptor FAS) (6.7%), oncogenes (como c-jun, JunB, Wisp2), aquellos relacionados con el ciclo celular (7.2%), proliferación (como el supresor tumoral Cdkn2a) (10.5%), etc. Resulta curioso comprobar cómo no hay un elevado número de genes implicados en los procesos inflamatorios (6.7%) en comparación con los otros grupos (*Tabla 13*).

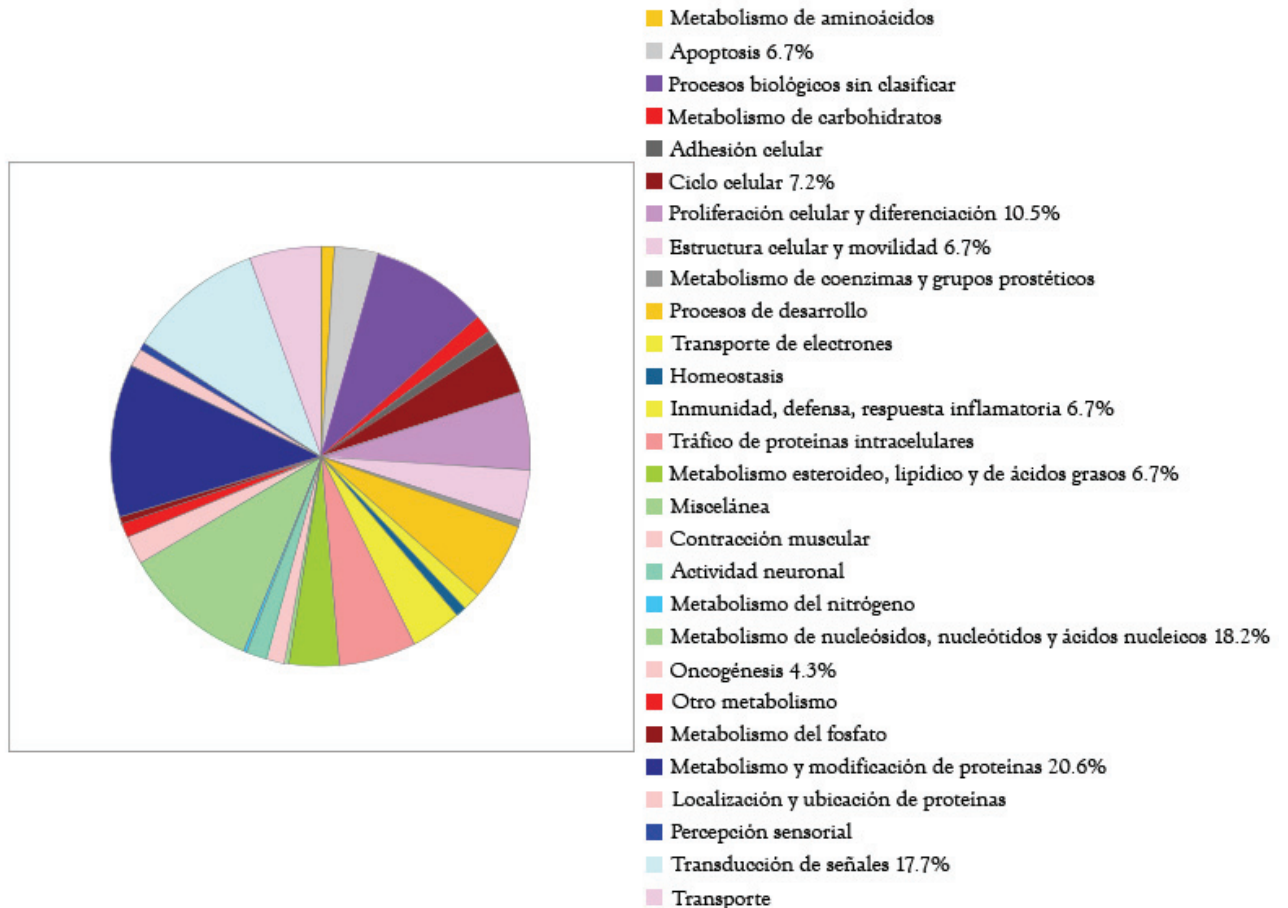


Figura 15. Esquema simplificado de los procesos biológicos (según PANTHER) en que se clasifican los genes seleccionados para el grupo hidroxitirosol.

Las secuencias se muestran ordenadas según su nivel de significación estadística obtenido en el análisis bioinformático de los arrays ($P < 0.05$), además de mostrarse su cambio de expresión.

Tabla 13. Genes del grupo hidroxitirosol implicados en algunos procesos biológicos (PANTHER).

<i>Procesos Biológicos</i>	<i>Símbolo del Gen</i>	<i>FC</i>	<i>P<0.05</i>
APOPTOSIS (6.7%)			
TNF receptor superfamily, member 6 (FAS)	Tnfrsf6	1.62	0.0018
apoptotic chromatin condensation inducer 1	Acin1	0.85	0.0069
secreted frizzled-related protein 4	Sfrp4	6.54	0.0085
testis enhanced gene transcript	Tegt	1.12	0.0088
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Cebpa	1.20	0.0088
deoxyribonuclease II	Dnase2	1.19	0.0161
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	1.07	0.0224
epithelial membrane protein 2	Emp2	1.35	0.0227
thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2	1.19	0.0241
activating transcription factor 3	Atf3	0.39	0.0293
mast cell protease 10	Mcpt10	0.64	0.0395
mast cell protease 9	Mcpt9	0.64	0.0395
mast cell protease 8	Mcpt8	0.64	0.0395
caspase 4	Casp4	0.76	0.0452
CICLO CELULAR (7.2%)			
epidermal growth factor receptor	Egfr	1.17	0.0030
ubiquitin-conjugating enzyme E2B	Ube2b	0.48	0.0033
Jun oncogene	Jun	0.60	0.0047
cyclin L2	Ccnl2	0.68	0.0048
high mobility group nucleosomal binding domain 2	Hmgn2	0.63	0.0050
coilin	Coil	1.10	0.0152
ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	Actr2	1.10	0.0179
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2	1.19	0.0241
cyclin L1	Ccnl1	0.63	0.0270
Jun-B oncogene	Junb	0.77	0.0308
casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	0.64	0.0319
minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	Mcm7	0.78	0.0340
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide (14-3-3)	Ywhab	1.13	0.0440
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Cdkn2a	2.39	0.0476
PROLIFERACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN (10.5%)			
myeloid differentiation primary response gene 116	Myd116	0.73	0.0015
epidermal growth factor receptor	Egfr	1.17	0.0030
ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homolog (S. cerevisiae)	Ube2b	0.48	0.0033
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	Mafg	0.76	0.0039
Jun oncogene	Jun	0.60	0.0047
cyclin L2	Ccnl2	0.68	0.0048
solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	Slc29a2	0.76	0.0070

<i>(Continuación Tabla 13).</i>			
secreted frizzled-related protein 4	Sfrp4	6.54	0.0085
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Cebpa	1.20	0.0088
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	0.46	0.0114
basic helix-loop-helix domain containing, class B2	Bhlhb2	0.54	0.0117
fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	1.38	0.0180
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
epithelial membrane protein 2	Emp2	1.35	0.0227
RAS, dexamethasone-induced 1	Rasd1	0.56	0.0234
thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2	1.19	0.0241
cyclin L1	Ccnl1	0.63	0.0270
a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)	Adam15	1.28	0.0296
Jun-B oncogene	Junb	0.77	0.0308
casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	0.64	0.0319
FMS-like tyrosine kinase 1	Flt1	0.75	0.0405
interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	1.15	0.0486
ESTRUCTURA CELULAR Y MOVILIDAD (6.7%)			
tropomyosin 1, alpha	Tpm1	1.27	0.0035
spectrin beta 2	Spnb2	1.45	0.0045
cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	Cdc42	1.11	0.0100
ras homolog gene family, member V	Rhov	1.32	0.0104
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	0.46	0.0114
PDZ and LIM domain 3	Pdlim3	3.38	0.0160
ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	Actr2	1.10	0.0179
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
epithelial membrane protein 2	Emp2	1.35	0.0227
ADP-ribosylation factor interacting protein 2	Arfip2	0.82	0.0299
casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	0.64	0.0319
ras homolog gene family, member J	Rhoj	1.29	0.0329
adducin 3 (gamma)	Add3	1.59	0.0438
formin binding protein 4	Fnbp4	0.61	0.0464
INMUNIDAD, DEFENSA, RESPUESTA INFLAMATORIA (6.7%)			
X-box binding protein 1	Xbp1	0.82	0.0048
immediate early response 3	Ier3	0.53	0.0077
peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	Ppif	0.86	0.0104
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	0.46	0.0114
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
leucine-rich repeat-containing 8	Lrrc8	1.38	0.0211
abhydrolase domain containing 14b	Abhd14b	1.27	0.0230
sequestosome 1	Sqstm1	0.47	0.0267
glutathione S-transferase, mu 2	Gstm2	1.50	0.0392
mast cell protease 10	Mcpt10	0.64	0.0395

(Continuación Tabla 13).

mast cell protease 9	Mcpt9	0.64	0.0395
mast cell protease 8	Mcpt8	0.64	0.0395
interleukin 6 signal transducer	Il6st	1.39	0.0485
interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	1.15	0.0486
METABOLISMO ESTEROIDEO, LIPÍDICO Y DE ÁCIDOS GRASOS (6.7%)			
cytochrome b5 reductase 3	Cyb5r3	1.13	0.0025
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	Abca1	2.02	0.0109
SEC14-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Sec14l2	1.35	0.0150
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	1.07	0.0224
synaptojanin 1	Synj1	1.28	0.0234
apolipoprotein C-I	Apoc1	0.83	0.0272
synaptojanin 2	Synj2	1.10	0.0296
prosaposin	Psap	0.57	0.0326
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	Abcg1	1.35	0.0335
phosphatidic acid phosphatase type 2B	Ppap2b	1.53	0.0379
cholesterol 25-hydroxylase	Ch25h	0.55	0.0403
adipose differentiation related protein	Adfp	0.74	0.0406
phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine	Pcyt2	0.85	0.0423
carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	Cpt1a	1.18	0.0474
METABOLISMO DE NUCLEÓSIDOS, NUCLEÓTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (18.2%)			
period homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	Per2	0.48	0.0004
survival of motor neuron protein interacting protein 1	Sip1	0.80	0.0014
ribonucleic acid binding protein S1	Rnps1	0.46	0.0028
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	Mafg	0.76	0.0039
HpaII tiny fragments locus 9c	Htf9c	0.74	0.0043
Jun oncogene	Jun	0.60	0.0047
cyclin L2	Ccnl2	0.68	0.0048
X-box binding protein 1	Xbp1	0.82	0.0048
high mobility group nucleosomal binding domain 2	Hmgn2	0.63	0.0050
period homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	Per1	0.61	0.0062
solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	Slc29a2	0.76	0.0070
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Cebpa	1.20	0.0088
basic helix-loop-helix domain containing, class B2	Bhlhb2	0.54	0.0117
deoxyribonuclease II	Dnase2	1.19	0.0161
zinc finger protein 148	Zfp148	1.11	0.0169
nucleolar protein 5A	Nol5a	0.76	0.0174
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	Smarca2	1.40	0.0185
nuclear receptor co-repressor 1	Ncor1	0.71	0.0187
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	Ddx39	0.80	0.0192

<i>(Continuación Tabla 13).</i>			
RNA polymerase 1-2	Rpo1-2	0.82	0.0200
cut-like 1 (<i>Drosophila</i>)	Cut1	1.14	0.0236
cyclin L1	Ccn1	0.63	0.0270
peter pan homolog (<i>Drosophila</i>)	Ppan	0.73	0.0274
activating transcription factor 3	Atf3	0.39	0.0293
Jun-B oncogene	Junb	0.77	0.0308
histone deacetylase 10	Hdac10	0.76	0.0308
Werner helicase interacting protein 1	Wrnip1	0.88	0.0316
casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	0.64	0.0319
minichromosome maintenance deficient 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	Mcm7	0.78	0.0340
nuclear factor I/X	Nfix	1.24	0.0369
PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog (yeast)	Pprf18	0.84	0.0391
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2	1.33	0.0405
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Atp5b	0.46	0.0422
RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2	Rnpc2	0.55	0.0454
chromobox homolog 6	Cbx6	1.22	0.0459
sirtuin 6	Sirt6	0.92	0.0470
queuine tRNA-ribosyltransferase 1	Qtrt1	0.83	0.0489
zinc finger protein 96	Zfp96	0.86	0.0492
ONCOGENESIS (4.3%)			
epidermal growth factor receptor	Egfr	1.17	0.0030
Jun oncogene	Jun	0.60	0.0047
fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	1.38	0.0180
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
Jun-B oncogene	Junb	0.77	0.0308
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Wisp2	3.58	0.0365
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2	1.33	0.0405
cadherin 13	Cdh13	1.40	0.0411
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Cdkn2a	2.39	0.0476
METABOLISMO Y MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (20.6%)			
xylosyltransferase II	Xylt2	1.25	0.0017
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	Galnt10	0.65	0.0021
epidermal growth factor receptor	Egfr	1.17	0.0030
ubiquitin-conjugating enzyme E2B	Ube2b	0.48	0.0033
receptor interacting protein kinase 5	Ripk5	1.22	0.0056
nucleotide binding protein 1	Nubp1	0.88	0.0060
mannosidase, beta A, lysosomal	Manba	1.30	0.0077
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	Pdk2	1.21	0.0077
quiescin Q6	Qscn6	1.57	0.0084

<i>(Continuación Tabla 13).</i>			
protein disulfide isomerase associated 3	Pdia3	0.40	0.0087
SNF1-like kinase	Snf1lk	0.73	0.0094
ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3	Ube2d3	1.21	0.0104
peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	Ppif	0.86	0.0104
eukaryotic translation initiation factor 4A2	Eif4a2	0.44	0.0112
SUMO/sentrin specific peptidase 3	Senp3	0.83	0.0136
tripartite motif protein 2	Trim2	1.45	0.0137
O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	Ogt	0.86	0.0161
fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	1.38	0.0180
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	Eif3s10	0.87	0.0219
phosphatidylinositol glycan, class L	Pigl	0.83	0.0224
thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2	1.19	0.0241
ribosomal protein S24	Rps24	0.47	0.0252
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Serpine1	0.74	0.0258
sequestosome 1	Sqstm1	0.47	0.0267
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4A	Nedd4a	1.06	0.0268
mannosidase 2, alpha 1	Man2a1	1.20	0.0281
a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)	Adam15	1.28	0.0296
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	Serpina3n	3.16	0.0297
casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	0.64	0.0319
phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)	Phkg2	0.87	0.0326
nardilysin, N-arginine dibasic convertase 1	Nrd1	0.54	0.0368
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	Dnajb9	0.83	0.0376
mast cell protease 10	Mcpt10	0.64	0.0395
mast cell protease 9	Mcpt9	0.64	0.0395
mast cell protease 8	Mcpt8	0.64	0.0395
FMS-like tyrosine kinase 1	Flt1	0.75	0.0405
protein kinase inhibitor, gamma	Pkig	0.82	0.0412
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	Ppp1r14a	1.36	0.0426
adducin 3 (gamma)	Add3	1.59	0.0438
caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	Casp4	0.76	0.0452
gamma-glutamyltransferase-like activity 1	Ggtla1	1.26	0.0473
phosphatidylinositol glycan, class K	Pigk	1.12	0.0490
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES (17.7%)			
glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	Gpld1	0.81	0.0000
period homolog 2 (Drosophila)	Per2	0.48	0.0004
epidermal growth factor receptor	Egfr	1.17	0.0030
Jun oncogene	Jun	0.60	0.0047
period homolog 1 (Drosophila)	Per1	0.61	0.0062

(Continuación Tabla 13).

gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1	Gabbr1	1.19	0.0070
cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	Cdc42	1.11	0.0100
ras homolog gene family, member V	Rhov	1.32	0.0104
A kinase (PRKA) anchor protein 1	Akap1	1.07	0.0113
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	0.46	0.0114
O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	Ogt	0.86	0.0161
fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	1.38	0.0180
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	1.40	0.0186
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	1.07	0.0224
RAS, dexamethasone-induced 1	Rasd1	0.56	0.0234
mitogen activated protein kinase 8 interacting protein	Mapk8ip	0.95	0.0262
membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3	Magi3	1.19	0.0290
a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)	Adam15	1.28	0.0296
S100 calcium binding protein A1	S100a1	1.32	0.0297
Jun-B oncogene	Junb	0.77	0.0308
casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	0.64	0.0319
progesterone receptor membrane component 2	Pgrmc2	1.09	0.0320
epsin 3	Epn3	1.39	0.0322
granulin	Grn	1.13	0.0356
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Wisp2	3.58	0.0365
phosphatidic acid phosphatase type 2B	Ppap2b	1.53	0.0379
amyloid beta (A4) precursor protein	App	1.90	0.0400
FMS-like tyrosine kinase 1	Flt1	0.75	0.0405
cadherin 13	Cdh13	1.40	0.0411
protein kinase inhibitor, gamma	Pkig	0.82	0.0412
ras homolog gene family, member J	Rhoj	0.82	0.0412
RAB31, member RAS oncogene family	Rab31	1.33	0.0419
stanniocalcin 1	Stc1	0.67	0.0435
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide (14-3-3)	Ywhab	1.13	0.0440
prolactin receptor	Prlr	1.50	0.0450
interleukin 6 signal transducer	Il6st	1.39	0.0485
interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	1.15	0.0486
FC. Fold change o Cambio de expresión.			

VI.3.2.- GRUPO DMBA.

Tras la eliminación de las secuencias no conocidas, predicciones, LOCUS, etc. de la lista de secuencias significativas del grupo DMBA (402), se obtuvo una lista reducida de

160 genes a la que se le realizó el análisis funcional. Tras la aplicación de la herramienta DAVID se pudo comprobar que los genes seleccionados en el grupo DMBA, están implicados en procesos importantes como la muerte celular y su regulación, o la diferenciación celular, angiogénesis, desarrollo de órganos y expresión génica, etc., (*Tabla 14*).

Tabla 14. Análisis funcional de los genes del grupo DMBA procedentes del microarray según su proceso biológico (DAVID).

<i>Proceso Biológico</i>	<i>Número Genes</i>	<i>% Genes</i>	<i>P<0.05</i>
Proceso metabólico de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	45	31	0.0001
Proceso metabólico de biomoléculas	56	39	0.0002
Diferenciación celular	29	20	0.0011
Regulación de procesos celulares	45	31	0.0025
Regulación de procesos metabólicos celulares	30	21	0.0031
Regulación de procesos metabólicos	31	21	0.0031
Transcripción ADN dependiente	26	18	0.0042
Regulación de expresión génica	28	19	0.0047
Desarrollo de órganos	23	16	0.0048
Regulación de la muerte celular programada	13	9	0.0058
Regulación de la transcripción	25	17	0.0130
Biogénesis y organización de membranas	8	6	0.0150
Procesado de ARNm	6	4	0.0170
Formación de estructuras anatómicas	6	4	0.0200
Muerte celular	14	10	0.0220
Regulación negativa de procesos metabólicos	9	6	0.0230
Comportamiento locomotor	6	4	0.0250
Desarrollo embrionario	8	6	0.0310
Angiogénesis	5	3	0.0350
Regulación negativa de procesos biológicos	17	12	0.0360
Desarrollo de sistemas	25	17	0.0390
Regulación negativa de procesos celulares	16	11	0.0400
Proceso metabólico del alcohol	8	6	0.0410

Si se observan más detenidamente algunos de los procesos usando la herramienta PANTHER, se pueden comprobar aquellas rutas que están implicadas en el grupo DMBA (*Figura 16*). Así por ejemplo, hay genes que codifican factores de crecimiento (como *Pdgfra*, *Fgfr1*). Además, se observa una mayor cantidad de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (como *Lct4s*, *Nmi*, *S100a8*, *S100a9*, *Kng1*) (11.8%) y proliferación

celular (como Pdgfra, Btc, o incluso el supresor del ciclo Cdkn1a) (7.6%) con respecto al grupo HT. Lo contrario ocurre en aquellos relacionados con los procesos apoptóticos (4.2%) y ciclo celular (como Cdkn1a, Pola2) (4.8%) (*Tabla 15*).

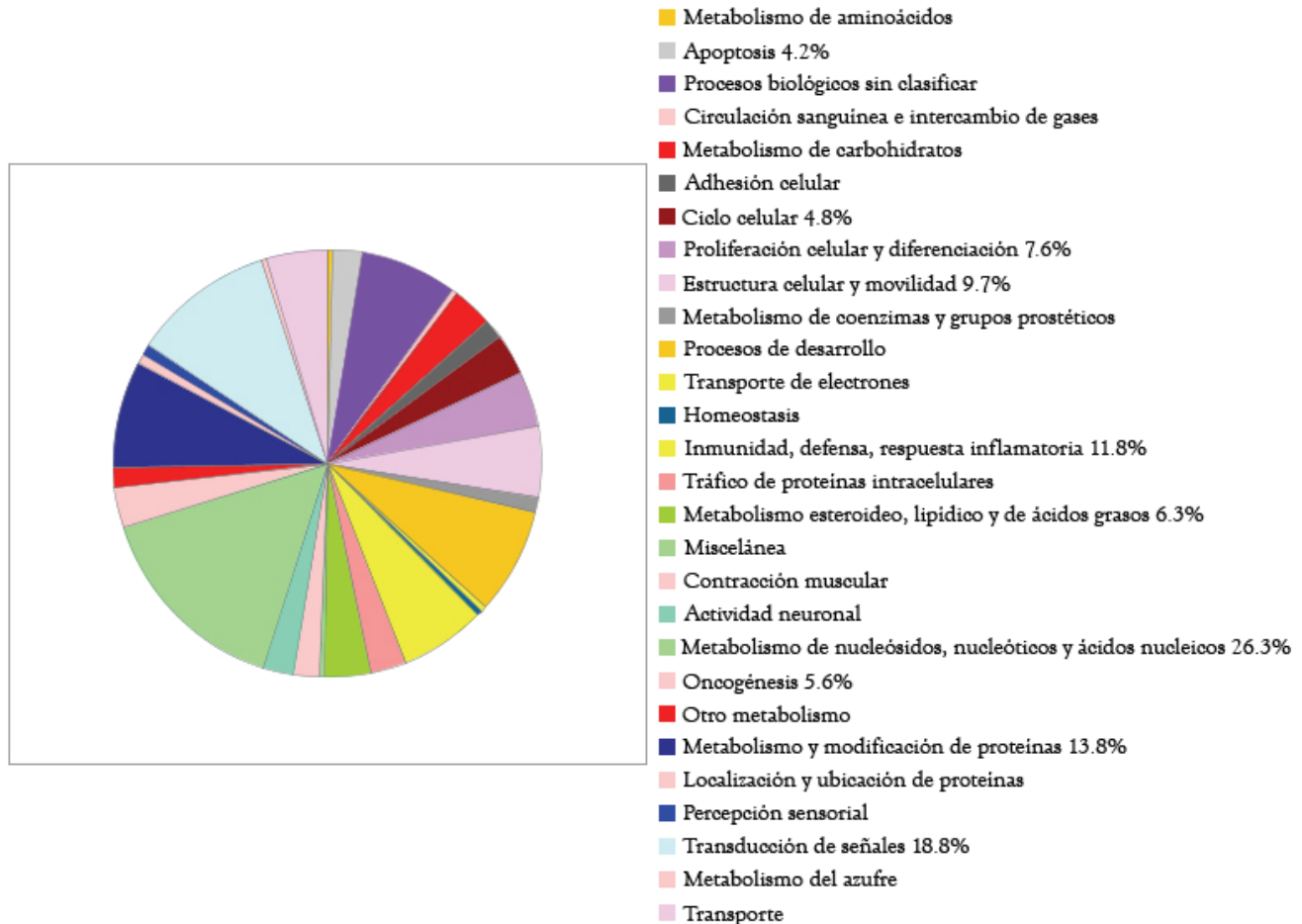


Figura 16. Esquema simplificado de los procesos biológicos (según PANTHER) en que se clasifican los genes seleccionados para el grupo DMBA.

Las secuencias se muestran ordenadas según su nivel de significación estadística obtenido en el análisis bioinformático de los arrays ($P < 0.05$), además de mostrarse su cambio de expresión.

Tabla 15. Genes del grupo DMBA implicados en algunos procesos biológicos (PANTHER).

<i>Procesos Biológicos</i>	<i>Símbolo del Gen</i>	<i>FC</i>	<i>P < 0.05</i>
APOPTOSIS (4.2%)			
chymase 1, mast cell	Cma1	0.44	0.0095
myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl1	1.11	0.0211

<i>(Continuación Tabla 15).</i>			
ubiquitin-conjugating enzyme E2Z (putative)	Ube2z	1.04	0.0263
protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	Ppp1cb	0.46	0.0421
neurotrophin receptor associated death domain	Nradd	0.85	0.0438
mast cell protease 1	Mcpt1	0.45	0.0482
CICLO CELULAR (4.8%)			
caldesmon 1	Cald1	0.71	0.0042
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	1.37	0.0161
cyclin L2	Ccnl2	0.70	0.0204
polymerase (DNA directed), alpha 2	Pola2	0.71	0.0216
coilin	Coil	0.75	0.0364
ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homolog (S. cerevisiae)	Ube2b	0.50	0.0415
forkhead box O1A	Foxo1a	0.76	0.0473
PROLIFERACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN (7.6%)			
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	2.67	0.0096
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	1.37	0.0161
KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	Khdrbs1	0.90	0.0173
cyclin L2	Ccnl2	0.70	0.0204
Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	0.53	0.0323
ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homolog (S. cerevisiae)	Ube2b	0.50	0.0415
betacellulin	Btc	0.43	0.0440
transforming growth factor, beta 2	Tgfb2	2.11	0.0458
solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	Slc29a2	0.84	0.0468
forkhead box O1A	Foxo1a	0.76	0.0473
inhibin beta-B	Inhbb	1.36	0.0474
ESTRUCTURA CELULAR Y MOVILIDAD (9.7%)			
keratin complex 2, basic, gene 5	Krt2-5	2.99	0.0020
caldesmon 1	Cald1	0.71	0.0042
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	2.67	0.0096
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	Myh9	0.74	0.0212
TRIO and F-actin binding protein	Triobp	0.81	0.0245
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdprk1	0.74	0.0276
cortactin	Cttn	1.15	0.0292
lin-7 homolog C (C. elegans)	Lin7c	0.84	0.0309
dynamamin 1	Dnm1	1.32	0.0321
tropomyosin 1, alpha	Tpm1	0.81	0.0350
protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	Ppp1cb	0.46	0.0421
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	2.88	0.0456
forkhead box O1A	Foxo1a	0.76	0.0473
A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	Akap9	0.69	0.0488
INMUNIDAD, DEFENSA, RESPUESTA INFLAMATORIA (11.8%)			
N-myc (and STAT) interactor	Nmi	1.24	0.0002

<i>(Continuación Tabla 15).</i>			
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	Ppp2r2b	2.39	0.0029
SH2 domain containing 4A	Sh2d4a	1.62	0.0065
nuclear transcription factor-Y alpha	Nfya	0.81	0.0068
chymase 1, mast cell	Cma1	0.44	0.0095
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	2.67	0.0096
mast cell antigen 32	Mca32	0.59	0.0251
Cd200 antigen	Cd200	0.36	0.0328
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9	3.03	0.0329
leukotriene C4 synthase	Ltc4s	1.78	0.0332
coagulation factor VIII	F8	0.76	0.0338
kininogen 1	Kng1	3.05	0.0378
prostaglandin D2 synthase 2	Ptgds2	0.69	0.0424
TAP binding protein	Tapbp	1.17	0.0445
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	2.88	0.0456
angiopoietin-like 4	Angptl4	2.17	0.0457
mast cell protease 1	Mcpt1	0.45	0.0482
METABOLISMO ESTEROIDEO, LIPÍDICO Y DE ÁCIDOS GRASOS (6.3%)			
elastase 1, pancreatic	Ela1	1.59	0.0036
ATP citrate lyase	Acly	0.76	0.0063
cellular retinoic acid binding protein 2	Crabp2	0.86	0.0170
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	St3gal5	1.29	0.0185
phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine	Pcyt2	0.89	0.0239
phospholipase D1	Pld1	1.14	0.0329
leukotriene C4 synthase	Ltc4s	1.78	0.0332
prostaglandin D2 synthase 2	Ptgds2	0.69	0.0424
peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	Peci	1.29	0.0427
METABOLISMO DE NUCLEÓSIDOS, NUCLEÓTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (26.3%)			
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	Ddx17	0.68	0.0037
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10	Mllr10	0.53	0.0065
nuclear transcription factor-Y alpha	Nfya	0.81	0.0068
interferon stimulated exonuclease gene 20-like 2	Isg20l2	0.79	0.0075
thyrotroph embryonic factor	Tef	0.66	0.0078
period homolog 2 (Drosophila)	Per2	0.40	0.0079
ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)	Rod1	0.75	0.0079
zinc finger, MYND domain containing 11	Zmynd11	0.45	0.0122
D site albumin promoter binding protein	Dbp	0.41	0.0155
nuclear receptor co-repressor 1	Ncor1	0.57	0.0156
progesterone receptor	Pgr	0.37	0.0158
splicing factor, arginine/serine-rich 15	Sfrs15	0.85	0.0167

<i>(Continuación Tabla 15).</i>			
inhibitor of DNA binding 1	Id1	2.08	0.0178
cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	Tia1	0.48	0.0179
cyclin L2	Ccnl2	0.70	0.0204
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	Smarca4	0.74	0.0205
RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2	Rnpc2	0.55	0.0206
polymerase (DNA directed), alpha 2	Pola2	0.71	0.0216
transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	Tgfb1i4	1.11	0.0279
ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit C, isoform 2	Atp6v1c2	1.37	0.0286
ribonucleic acid binding protein S1	Rnps1	0.51	0.0287
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	0.84	0.0309
Nipped-B homolog (Drosophila)	NIPBL	0.78	0.0315
RAD23a homolog (S. cerevisiae)	Rad23a	1.09	0.0331
synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	Syncrip	0.85	0.0354
prostate tumor over expressed gene 1	Ptov1	0.90	0.0364
nuclear transcription factor, X-box binding 1	Nfx1	0.88	0.0388
activating transcription factor 2	Atf2	0.88	0.0396
cut-like 1 (Drosophila)	Cutl1	0.84	0.0407
pre-mRNA processing factor 8	Prpf8	0.77	0.0409
protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	Ppp1cb	0.46	0.0421
zinc finger protein 91	Zfp91	0.85	0.0424
nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)	Nploc4	0.90	0.0462
solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	Slc29a2	0.84	0.0468
Kruppel-like factor 10	Klf10	1.57	0.0473
forkhead box O1A	Foxo1a	0.76	0.0473
REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54 like (S. cerevisiae)	Rev3l	0.72	0.0479
Max protein	Max	0.71	0.0483
ONCOGENESIS (5.6%)			
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10	Mllt10	0.53	0.0065
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	2.67	0.0096
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	Mll5	0.58	0.0104
progesterone receptor	Pgr	0.37	0.0158
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	1.37	0.0161
tetraspanin 8	Tspan8	2.09	0.0168
myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl1	1.11	0.0211
Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	0.53	0.0323
METABOLISMO Y MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (13.8%)			
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	Ppp2r2b	2.39	0.0029
elastase 1, pancreatic	Ela1	1.59	0.0036
ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	Ube2l6	1.36	0.0068

<i>(Continuación Tabla 15).</i>			
ubiquitously expressed transcript	Uxt	1.10	0.0073
chymase 1, mast cell	Cma1	0.44	0.0095
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	2.67	0.0096
carboxypeptidase A3	Cpa3	0.56	0.0176
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	St3gal5	1.29	0.0185
tryptase alpha/beta 1	Tpsab1	0.38	0.0188
myosin light chain kinase 2, skeletal muscle	Mylk2	1.14	0.0228
CDC-like kinase 1	Clk1	0.63	0.0238
ubiquitin-conjugating enzyme E2Z (putative)	Ube2z	1.04	0.0263
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdk1	0.74	0.0276
ubiquitin specific peptidase 33	Usp33	0.55	0.0302
Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	0.53	0.0323
O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	Ogt	0.61	0.0342
ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homolog (S. cerevisiae)	Ube2b	0.50	0.0415
protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	Ppp1cb	0.46	0.0421
mast cell protease 1	Mcpt1	0.45	0.0482
eukaryotic translation initiation factor 4A2	Eif4a2	0.56	0.0495
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES (18.8%)			
N-myc (and STAT) interactor	Nmi	1.24	0.0002
lamimin, gamma 2	Lamc2	0.73	0.0055
period homolog 2 (Drosophila)	Per2	0.40	0.0079
platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	2.67	0.0096
protocadherin alpha 4	Pcdha4	1.51	0.0156
progesterone receptor	Pgr	0.37	0.0158
tetraspanin 8	Tspan8	2.09	0.0168
cellular retinoic acid binding protein 2	Crabp2	0.86	0.0170
TRIO and F-actin binding protein	Triobp	0.81	0.0245
mast cell antigen 32	Mca32	0.59	0.0251
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdk1	0.74	0.0276
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	0.84	0.0309
protein kinase inhibitor beta, cAMP dependent, catalytic	Pkib	1.36	0.0316
Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	0.53	0.0323
Cd200 antigen	Cd200	0.36	0.0328
phospholipase D1	Pld1	1.14	0.0329
gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1	Gabbr1	0.63	0.0329
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9	3.03	0.0329
coagulation factor VIII	F8	0.76	0.0338
O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	Ogt	0.61	0.0342
activating transcription factor 2	Atf2	0.88	0.0396
angiopoietin 2	Angpt2	1.41	0.0430
neurotrophin receptor associated death domain	Nradd	0.85	0.0438

(Continuación Tabla 15).

betacellulin	Btc	0.43	0.0440
transforming growth factor, beta 2	Tgfb2	2.11	0.0458
forkhead box O1A	Foxo1a	0.76	0.0473
inhibin beta-B	Inhbb	1.36	0.0474

FC. Fold change o cambio de expresión.

VI.3.3.- GRUPO ADR.

Tras la eliminación de las secuencias no conocidas, predicciones, LOCUS, etc. de la lista de secuencias significativas del grupo adriamicina (285), se obtuvo una lista reducida de 116 genes a la que se le realizó el análisis funcional. Tras la aplicación de la herramienta DAVID sorprende la escasa información que obtenemos para este grupo. Apenas hay procesos biológicos en los que los genes se han clasificado, destacando la diferenciación celular, y el desarrollo de órganos y sistemas (*Tabla 16*).

Tabla 16. Análisis funcional de los genes del grupo adriamicina procedentes del microarray según su proceso biológico (DAVID).

<i>Proceso Biológico</i>	<i>Número Genes</i>	<i>% Genes</i>	<i>P<0.05</i>
Desarrollo de órganos	19	18	0.0021
Desarrollo de sistemas	23	22	0.0023
Movilidad celular	8	8	0.0180
Regulación positiva de procesos biológicos	14	13	0.0270
Biogénesis y organización de estructuras extracelulares	4	4	0.0300
Diferenciación celular	18	17	0.0410

Si se presta atención más detenidamente en algunos de los procesos usando la herramienta PANTHER, se pueden comprobar aquellas rutas que están implicadas en el grupo de adriamicina (*Figura 17*). Así por ejemplo, este sistema de clasificación nos muestra una menor cantidad de genes relacionados con la apoptosis (0.9%), proliferación (3.7%) y ciclo celular que el grupo HT. Sin embargo, es interesante como el metabolismo de lípidos está más aumentado para ADR (8.3%) que para HT (6.7%) y DMBA (6.3%). Con respecto a la respuesta inflamatoria, el grupo ADR tiene niveles intermedios (8.3%) con respecto a HT (6.7%) y DMBA (11.8%) (*Tabla 17*).

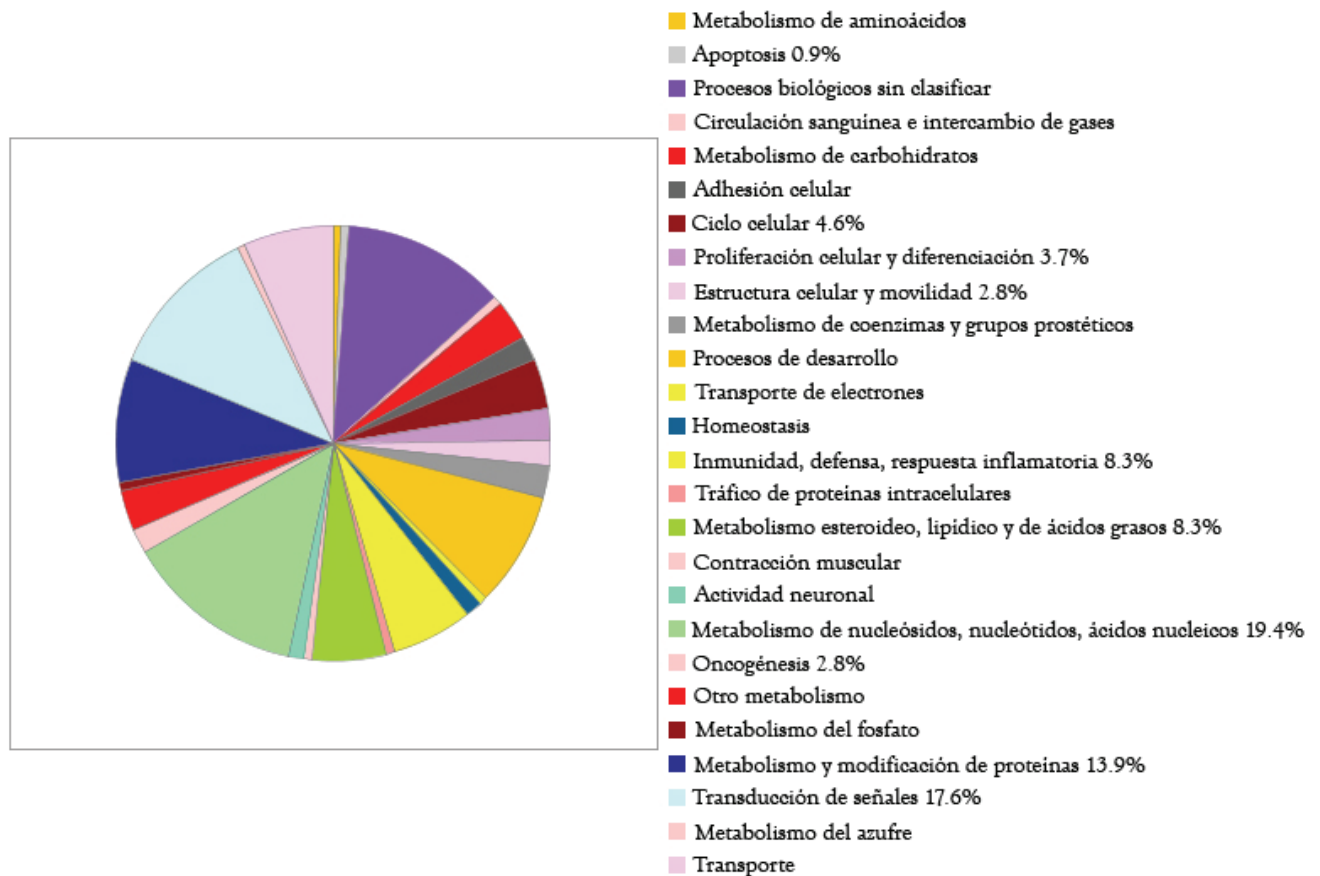


Figura 17. Esquema simplificado de los procesos biológicos (según PANTHER) en que se clasifican los genes seleccionados para el grupo ADR.

Las secuencias se muestran ordenadas según su nivel de significación estadística obtenido en el análisis bioinformático de los arrays ($P < 0.05$), además de mostrarse su cambio de expresión.

Tabla 17. Genes del grupo de adriamicina implicados en algunos procesos biológicos (PANTHER).

Procesos Biológicos	Símbolo del Gen	FC	$P < 0.05$
APOPTOSIS (0.9%)			
unc-5 homolog B (C. elegans)	Unc5b	0.71	0.0114
CICLO CELULAR (4.6%)			
cell division cycle 25 homolog B (S. cerevisiae)	Cdc25b	0.26	0.0008
ubiquitin-conjugating enzyme E2B	Ube2b	0.48	0.0240
coilin	Coil	0.74	0.0284
polymerase (DNA directed), alpha 2	Pola2	0.47	0.0457
cyclin L2	Ccnl2	0.67	0.0491

(Continuación Tabla 17).

PROLIFERACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN (3.7%)			
cell division cycle 25 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	Cdc25b	0.26	0.0008
fms-related tyrosine kinase 4	Flt4	3.03	0.0077
ubiquitin-conjugating enzyme E2B	Ube2b	0.48	0.0240
cyclin L2	Ccnl2	0.67	0.0491
ESTRUCTURA CELULAR Y MOVILIDAD (2.8%)			
G protein-coupled receptor kinase-interactor 2	Git2	0.51	0.0083
procollagen, type II, alpha 1	Col2a1	0.56	0.0191
tropomyosin 1, alpha	Tpm1	0.35	0.0313
INMUNIDAD, DEFENSA, RESPUESTA INFLAMATORIA (8.3%)			
sequestosome 1	Sqstm1	0.39	0.0073
RT1 class Ib, locus Aw2	RT1-Aw2	0.72	0.0163
glutathione S-transferase A3	Gsta3	1.31	0.0232
2'5'-oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	1.42	0.0301
regulator of G-protein signaling 1	Rgs1	1.50	0.0306
chemokine (C-C motif) ligand 11	Ccl11	9.23	0.0356
CD69 antigen	Cd69	2.20	0.0425
immediate early response 3	Ier3	0.64	0.0437
lipopolysaccharide binding protein	Lbp	2.58	0.0469
METABOLISMO ESTEROIDEO, LIPÍDICO Y DE ÁCIDOS GRASOS (8.3%)			
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	Hmgcr	0.78	0.0017
pyridoxine 5'-phosphate oxidase	Pnpo	1.14	0.0028
peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	Peci	1.26	0.0103
dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase	Dci	1.34	0.0156
glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	Gpam	2.27	0.0210
acyl-Coenzyme A binding domain containing 4	Acbd4	1.32	0.0268
thyroid hormone responsive protein	Thrsp	5.02	0.0301
lipopolysaccharide binding protein	Lbp	2.58	0.0469
START domain containing 10	Stard10	1.25	0.0495
METABOLISMO DE NUCLEÓSIDOS, NUCLEÓTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (19.4%)			
early growth response 2	Egr2	0.77	0.0019
early growth response 1	Egr1	0.72	0.0025
thyrotroph embryonic factor	Tef	0.60	0.0112
histone cluster 1, H4b	Hist1h4b	1.39	0.0177
Jun dimerization protein 1	Jdp1	1.59	0.0218
RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2	Rnpc2	0.54	0.0227
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Atp5b	0.48	0.0229
LIM domain only 4	Lmo4	0.61	0.0233
inhibitor of DNA binding 2	Id2	1.63	0.0258
poly(A) binding protein, nuclear 1	Pabpn1	0.50	0.0288

<i>(Continuación Tabla 17).</i>			
FUS interacting protein (serine-arginine rich) 1	Fusip1	0.72	0.0294
oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	1.42	0.0301
thyroid hormone responsive protein	Thrsp	5.02	0.0301
early growth response 3	Egr3	0.53	0.0312
D site albumin promoter binding protein	Dbp	0.45	0.0330
RNA binding motif protein 5	Rbm5	0.49	0.0338
splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	Sfpq	0.74	0.0382
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	Smarca2	0.54	0.0415
polymerase (DNA directed), alpha 2	Pola2	0.47	0.0457
ribonucleic acid binding protein S1	Rnps1	0.56	0.0488
cyclin L2	Ccnl2	0.67	0.0491
ONCOGENESIS (2.8%)			
LIM domain only 4	Lmo4	0.61	0.0233
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, Drosophila)	Mll5	0.65	0.0275
opioid growth factor receptor-like 1	Ogfrl1	1.45	0.0384
METABOLISMO Y MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (13.9%)			
cell division cycle 25 homolog B (S. cerevisiae)	Cdc25b	0.26	0.0008
serine/threonine/tyrosine interacting-like 1	Styl1	1.38	0.0039
sequestosome 1	Sqstm1	0.39	0.0073
fms-related tyrosine kinase 4	Flt4	3.03	0.0077
nardilysin, N-arginine dibasic convertase 1	Nrd1	0.63	0.0148
CDC-like kinase 1	Clk1	0.74	0.0186
ubiquitin-conjugating enzyme E2B	Ube2b	0.48	0.0240
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha	Ppp2r3a	0.78	0.0254
bone morphogenetic protein receptor, type 1A	Bmpr1a	1.60	0.0271
LIM motif-containing protein kinase 2	Limk2	0.45	0.0350
nucleotide binding protein 2	Nubp2	0.24	0.0358
whey acidic protein	Wap	2.39	0.0361
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	Galnt10	0.65	0.0431
calpain 8	Capn8	0.81	0.0482
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 2	Serpine2	0.72	0.0489
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES (17.6%)			
neuropeptide Y	Npy	0.19	0.0033
fms-related tyrosine kinase 4	Flt4	3.03	0.0077
G protein-coupled receptor kinase-interactor 2	Git2	0.51	0.0083
unc-5 homolog B (C. elegans)	Unc5b	0.71	0.0114
guanine nucleotide binding protein, alpha 14	Gna14	1.51	0.0135
growth arrest specific 6	Gas6	1.57	0.0153
growth hormone receptor	Ghr	1.84	0.0157

(Continuación Tabla 17).

Casitas B-lineage lymphoma c	Cblc	1.29	0.0180
stathmin-like 2	Stmn2	2.23	0.0229
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha	Ppp2r3a	0.78	0.0254
bone morphogenetic protein receptor, type 1A	Bmpr1a	1.60	0.0271
regulator of G-protein signaling 1	Rgs1	1.50	0.0306
LIM motif-containing protein kinase 2	Limk2	0.45	0.0350
chemokine (C-C motif) ligand 11	Ccl11	9.23	0.0356
adrenergic receptor, alpha 2a	Adra2a	2.03	0.0361
opioid growth factor receptor-like 1	Ogfr1	1.45	0.0384
insulin-like growth factor binding protein 6	Igfbp6	2.24	0.0441
wingless-related MMTV integration site 5B	Wnt5b	2.08	0.0445
calpain 8	Capn8	0.81	0.0482

FC. Fold change o cambio de expresión.

VI.4.- GENES SELECCIONADOS PARA SU VALIDACIÓN.

Siguiendo los criterios de selección previamente descritos (Material y Métodos. Apartado II.3.5.5) se obtuvo una lista de 185 genes para su confirmación por RTPCR (Tabla 18).

Tabla 18. Genes procedentes del microarray seleccionados para su validación.

<i>Símbolo del Gen</i>	<i>Nombre del Gen</i>	<i>P<0.05</i>
Ccl11	chemokine (C-C motif) ligand 11	0.0356
Sfrp4	secreted frizzled-related protein 4	0.0084
Fhl1	four and a half LIM domains 1	0.0353
Thrsp	thyroid hormone responsive protein	0.0301
Sgcg	sarcoglycan, gamma	0.0104
Ca3	carbonic anhydrase 3	0.0426
Pdlim3	PDZ and LIM domain 3	0.016
Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	0.0365
Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	0.0297
Kng1	kininogen 1	0.0378
Krt2-5	Keratin complex 2, basic, gene 5	0.0020
Nhn1; Flt4	Conserved nuclear protein Nhn1; Fms-related tyrosine kinase 4	0.0178
S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	0.0329
Lbp	lipopolysaccharide binding protein	0.0469
Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	0.0476
LOC315883	similar to phospholipid scramblase 2	0.0373
Ppp2r2b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	0.0028
Wap	whey acidic protein	0.0361
Gpam	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial; (F344/Crj)rearranged mRNA for T-cell receptor gamma chain (1483bp)	0.021
Angptl4	angiopoietin-like 4	0.0457

(Continuación Tabla 18).

Cd69	CD69 antigen	0.0425
Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6	0.0441
Stmn2	stathmin-like 2	0.0229
Hsd11b1; Tspan8	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1; tetraspanin 8	0.0168
Id1	inhibitor of DNA binding 1	0.0178
Kcnj11	potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	0.0487
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	0.0458
Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	0.0109
Adra2a	Adrenergic receptor, alpha 2a	0.0361
Cryab	crystallin, alpha B	0.0046
Kcns3	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3	0.0385
App	amyloid beta (A4) precursor protein	0.04
Ghr	growth hormone receptor	0.0157
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	0.0198
Cabc1	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like	0.0133
Ltc4s	leukotriene C4 synthase	0.0332
Id2	inhibitor of DNA binding 2	0.0258
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	0.0271
Tnfrsf6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	0.0017
Ela1	elastase 1, pancreatic	0.0036
Add3	adducin 3 (gamma)	0.0438
Jdp1	Jun dimerization protein 1	0.0218
Qscn6	quiescin Q6	0.0083
Klf10	Kruppel-like factor 10	0.0473
Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B	0.0379
Enpp3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	0.0171
Gna14	guanine nucleotide binding protein, alpha 14	0.0135
Rgs1	regulator of G-protein signaling 1	0.0306
Itga1	integrin alpha 1	0.0225
Prlr	prolactin receptor	0.045
Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2	0.0392
Pcdha4	protocadherin alpha 4	0.0156
Ris1	Ras-induced senescence 1	0.0335
Ca5b	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	0.0039
Ogfr1	opioid growth factor receptor-like 1	0.0384
Cdh13	cadherin 13	0.0411
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2	0.018
Il6st	interleukin 6 signal transducer	0.0485
Rab31	RAB31, member RAS oncogene family	0.0419
Akt2	thymoma viral proto-oncogene 2	0.0241
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	0.0474
Egr1; EGFR	epidermal growth factor receptor	0.0024
Il13ra1	interleukin 13 receptor, alpha 1	0.0486
Cdc42	cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	0.01
Oxr1	oxidation resistance 1	0.0301
Pigk	phosphatidylinositol glycan, class K	0.049
Rab10	RAB10, member RAS oncogene family	0.0042
Mapk8ip	mitogen activated protein kinase 8 interacting protein	0.0262
Bclaf1	BCL2-associated transcription factor 1	0.0346
Slc5a6	solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	0.0333
Pcyt2	Phosphate cytidyltransferase2	0.0423
Timm9	translocase of inner mitochondrial membrane 9	0.0481
Apoc1	apolipoprotein C-I	0.0272
Bhmt	Betaine-homocysteine methyltransferase	0.0452
Pkig	Protein kinase inhibitor, gamma	0.0412
Tssc4	tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment 4	0.0331
LOC298643	IGFBP-2-Binding Protein, Iip45	0.0178
Ddx39	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	0.0192
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	0.0452

(Continuación Tabla 18).

Fads1	fatty acid desaturase 1	0.0041
Junb	Jun-B oncogene	0.0308
Mem7	minichromosome maintenance deficient 7	0.034
Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	0.0165
Mafg	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	0.0038
Sdccag3	serologically defined colon cancer antigen 3	0.0121
Gclc	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	0.0296
Nexn	nexilin	0.02
Myh9	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	0.0212
Pdpk1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	0.0276
Sqle	squalene epoxidase	0.0380
Adfp	adipose differentiation related protein	0.0406
Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	0.0382
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	0.0233
Snf1lk	SNF1-like kinase	0.0094
Cnksr1	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	0.0069
Myd116	myeloid differentiation primary response gene 116	0.0015
Slc26a1	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 1	0.0441
Slc20a1	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	0.0159
Max	Max protein	0.0483
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	0.0341
Car11	carbonic anhydrase 11	0.0125
Ccnl2	cyclin L2	0.0204
Znf386	zinc finger protein 386 (Kruppel-like)	0.0438
Stc1	stanniocalcin 1	0.0336
Tef	thyrotroph embryonic factor	0.0078
Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	0.0079
Nnat	neuronatin	0.0223
Galnt10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	0.0020
Mcpt8; Mcpt9; Mcpt10; Mcpt8L2	mast cell protease 8; 9; 10; mast cell protease 8-like 2	0.0395
Csnk1a1	Casein kinase 1, alpha 1	0.0319
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1	0.0329
Hmg2	High mobility group nucleosomal binding domain 2	0.0049
Apbb3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3	0.0363
Matr3	matrin 3	0.0465
Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	0.0342
Slc12a2	Solute carrier family 12, member 2	0.0429
Ccnl1	cyclin L1	0.027
Jun	Jun oncogene	0.0047
Mca32	mast cell antigen 32	0.0251
Itm2b	Integral membrane protein 2B	0.0495
Psap	Prosaposin	0.0326
Ncor1	nuclear receptor co-repressor 1	0.0187
Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	
Bhlhb2	Basic helix-loop-helix domain containing, class B2	0.0117
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	0.0114
Egr3	Early growth response 3	0.0312
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	0.0412
Git2	G protein-coupled receptor kinase-interactor 2	0.0083
Gpc2	glypican 2 (cerebroglycan)	0.0296
Ier3	immediate early response 3	0.0077
Limk2	LIM motif-containing protein kinase 2	0.0350
Nrd1	Nardilysin, N-arginine dibasic convertase 1	0.0368
Ociad1	OCIA domain containing 1	0.0099

<i>(Continuación Tabla 18).</i>		
Pgr	Progesterone receptor	0.0158
Pim3	serine/threonine-protein kinase pim-3	0.0164
Pola2	Polymerase (DNA directed), alpha 2	0.0382
Ppp1cb	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	0.0421
Rnps1	Ribonucleic acid binding protein S1	0.0287
Rps24	ribosomal protein S24	0.0252
Serpina6	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6 (mapped)	0.0218
Sipa11	Signal-induced proliferation-associated 1 like 1	0.0228
Smarca2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	0.0185
Tfrc	transferrin receptor	0.0258
Tia1	Cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1	0.0179
Ube2b	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B	0.0415
Vof16	ischemia related factor vof-16	0.0082
Atf3	activating transcription factor 3	0.0293
Btc	betacellulin	0.0440
Cd200	Cd200 antigen	0.0328
Cdw92	CDW92 antigen	0.0101
Cma1	chymase 1, mast cell	0.0095
Eif4a2	Eukaryotic translation initiation factor 4A2	0.0112
Gp49b; LOC499078	glycoprotein 49b; similar to GP49B1	0.0293
Mcpt1	mast cell protease 1	0.0482
Pdia3	Protein disulfide isomerase associated 3	0.0087
Per2	period homolog 2 (Drosophila)	0.0004
Sqstm1	Sequestosome 1	0.0267
Tpm1	tropomyosin 1, alpha	0.0035
Tpsab1	tryptase alpha/beta 1	0.0188
Zmynd11	Zinc finger, MYND domain containing 11	0.0122
Cdc25b	cell division cycle 25 homolog B (S. cerevisiae)	0.0008
Hbaa1; LOC360504	hemoglobin alpha, adult chain 1; hemoglobin alpha 2 chain	0.0265
Hbb	hemoglobin beta chain complex	0.0157
Npy	neuropeptide Y	0.0033
Nubp2	Nucleotide binding protein 2	0.0358
Alas2	aminolevulinic acid synthase 2	0.0150
LOC287167	globin, alpha	0.0194

VII.- VALIDACIÓN MEDIANTE RTPCR CUANTITATIVA DE LAS SECUENCIAS SIGNIFICATIVAS OBTENIDAS POR MICROARRAY.

En este apartado se tratarán los siguientes puntos:

- 1) Análisis bioinformático de las secuencias seleccionadas.
- 2) Secuencias seleccionadas en cada grupo de estudio.

VII.1.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS SELECCIONADAS.

Tras el filtrado previo de las 185 secuencias seleccionadas mediante la relación C_T , la lista se redujo a 178 genes. Tras la normalización de los resultados de RTPCR para

obtener los valores de expresión, el análisis de PCA (Análisis de Componentes Principales) mostró la irregularidad en la distribución de las muestras, lo cual no permitió identificar una distribución por grupos de estudio (DMBA, ADR, HT). Esto indica la alta variabilidad que existe entre las muestras de todas las condiciones, encontrándose que la muestra 07SE140 (en rojo situada en la esquina inferior izquierda en la visión del PCA de la izquierda) es la que más se aleja del resto. (*Figura 18*).

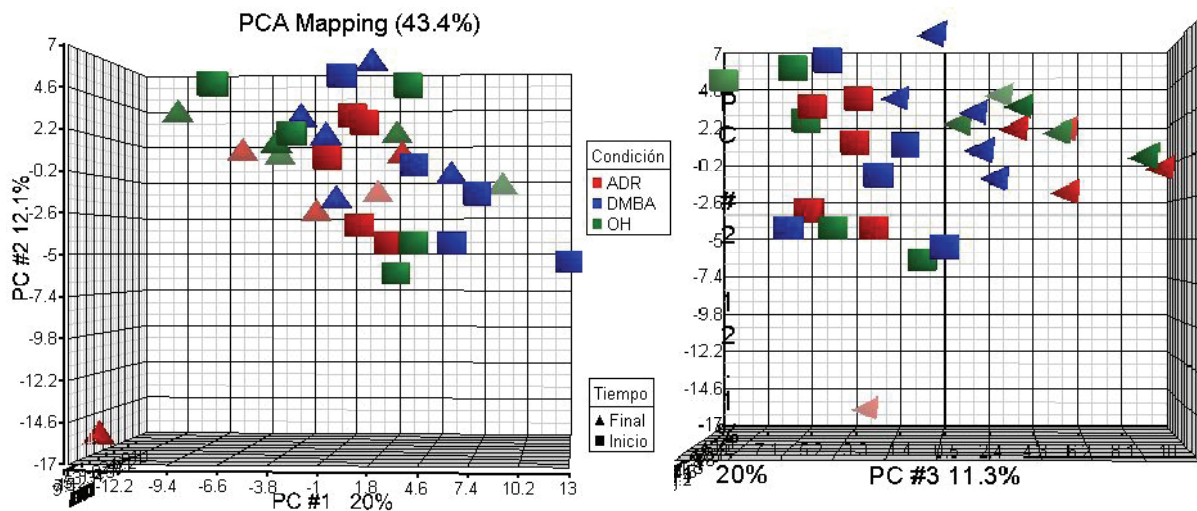


Figura 18. Dos visiones de PCA (Análisis de Componentes Principales): Columna izquierda Primera visión de PCA. Columna derecha Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3) realizadas a partir de los datos normalizados (178 genes). Ensayo RTPCR. En las dos imágenes las muestras están coloreadas según la condición y tienen una distinta forma de acuerdo al factor Tiempo. Porcentaje de variabilidad: 20% (eje 1); 12.1% (eje 2); 11.3% (eje 3). DMBA: grupo control de cáncer de mama, OH: grupo tratado con hidroxitirosol (HT), ADR: grupo tratado con adriamicina.

Además, las muestras tampoco presentaron una tendencia a la agrupación según las condiciones de estudio (INICIO, FINAL, ADR, DMBA, HT), como se aprecia en la *Figura 19*, que representa un clúster jerárquico no supervisado. Esto demuestra las amplias diferencias existentes entre cada una de las condiciones así como dentro de cada una de ellas.

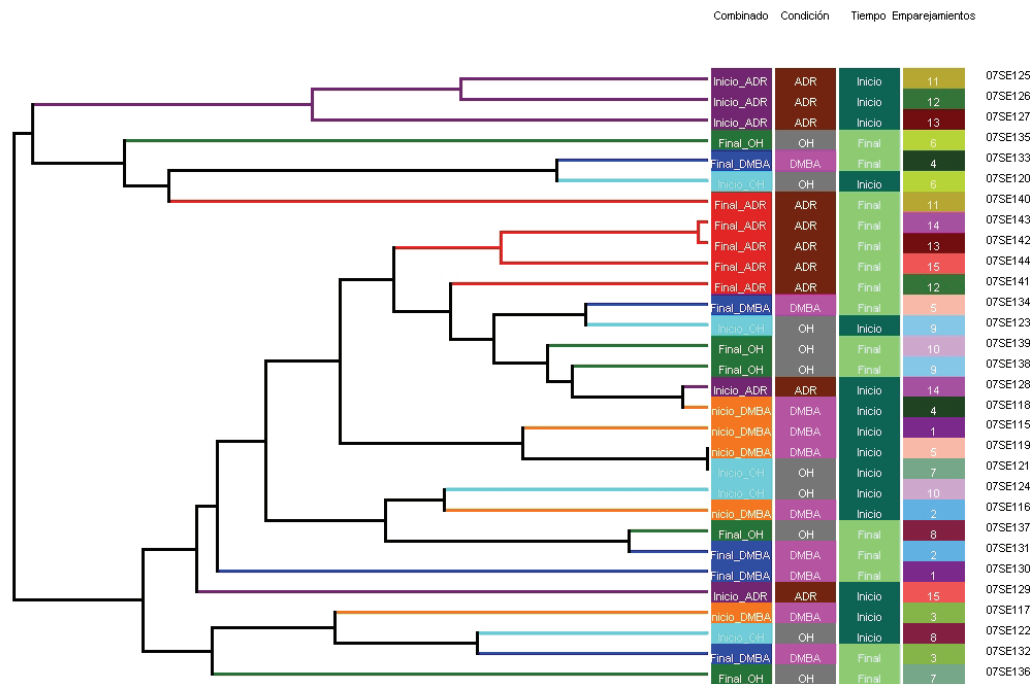


Figura 19. Clúster jerárquico de muestras realizado a partir de los datos normalizados. Ensayo RTPCR. DMBA: grupo control de cáncer de mama, OH: grupo tratado con hidroxitirosol (HT), ADR: grupo tratado con adriamicina.

Al igual que se hizo para el microarray, se realizaron aquí los últimos análisis sobre las comparaciones ADR vs HT vs DMBA. La finalidad era comprobar si representaban correctamente al tiempo en el que se comparan (INICIO y FINAL). Así pues, tanto el análisis PCA como el clúster jerárquico bidimensional para las comparaciones ADR vs HT vs DMBA Inicio (20 genes) (**Figura 20** y **Figura 21**) y ADR vs HT vs DMBA Final (16 genes) (**Figura 22**) no mostraron una agrupación correcta. Esta situación indica la alta variabilidad existente entre las muestras de cada condición (INICIO, FINAL, ADR, HT, DMBA).

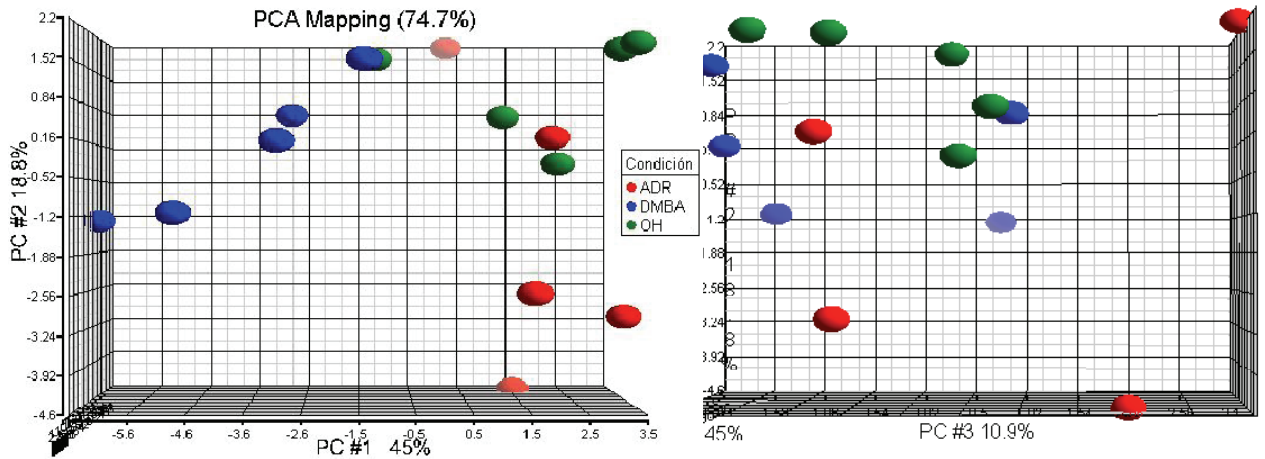


Figura 20. Dos visiones de PCA realizadas a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Inicio (20 genes): Columna izquierda Primera visión de PCA. Columna derecha Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3). Ensayo RTPCR. Porcentaje de variabilidad: 45% (eje 1), 18.8% (eje 2); 10.9% (eje 3). DMBA: grupo control de cáncer de mama, OH: grupo tratado con hidroxitirosol (HT), ADR: grupo tratado con adriamicina.

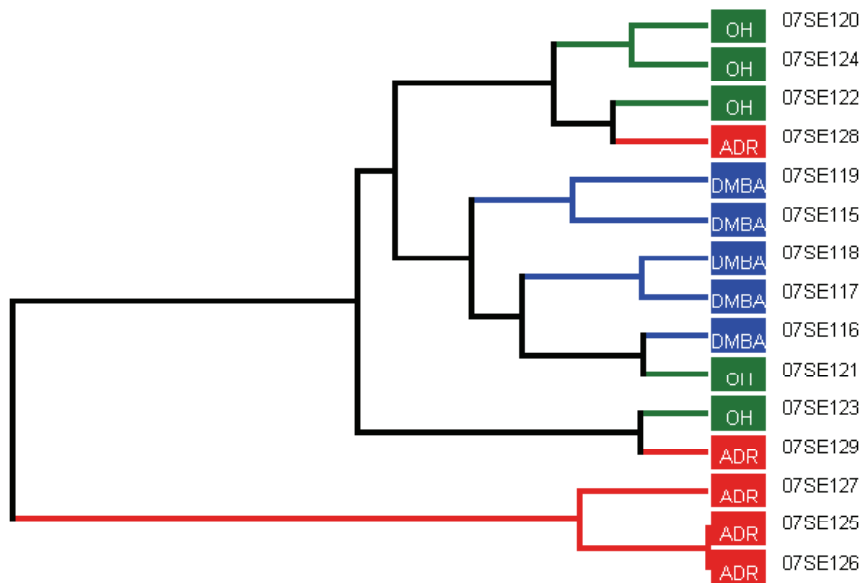


Figura 21. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Inicio (20 genes). Ensayo RTPCR. En las cuadrículas se codifican en azul, rojo o verde las muestras de cada condición. DMBA: grupo control de cáncer de mama, OH: grupo tratado con hidroxitirosol (HT), ADR: grupo tratado con adriamicina.

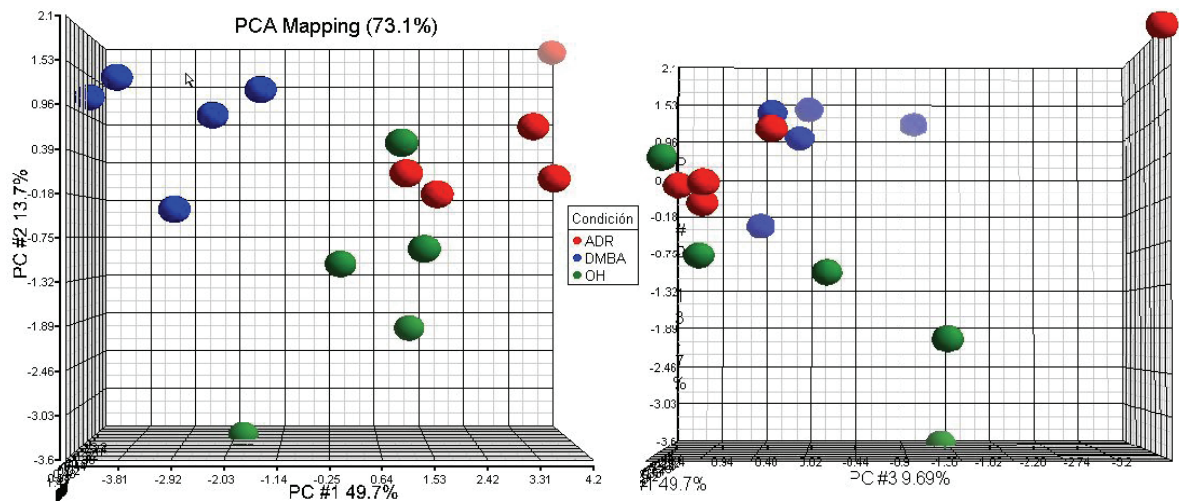


Figura 22. Dos visiones de PCA realizadas a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Final (16 genes): Columna izquierda Primera visión de PCA. Columna derecha Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3). Ensayo RTPCR. Porcentaje de variabilidad: 49.7% (eje 1), 13.7% (eje 2); 9.69% (eje 3). DMBA: grupo control de cáncer de mama, OH: grupo tratado con hidroxitirosol (HT), ADR: grupo tratado con adriamicina.

La **Figura 23** representa un clúster jerárquico bidimensional en el que se observa como las muestras de los grupos ADR, HT y DMBA parecen agruparse correctamente. Esto parece indicar que dichas secuencias representan de forma adecuada a la condición tiempo final.

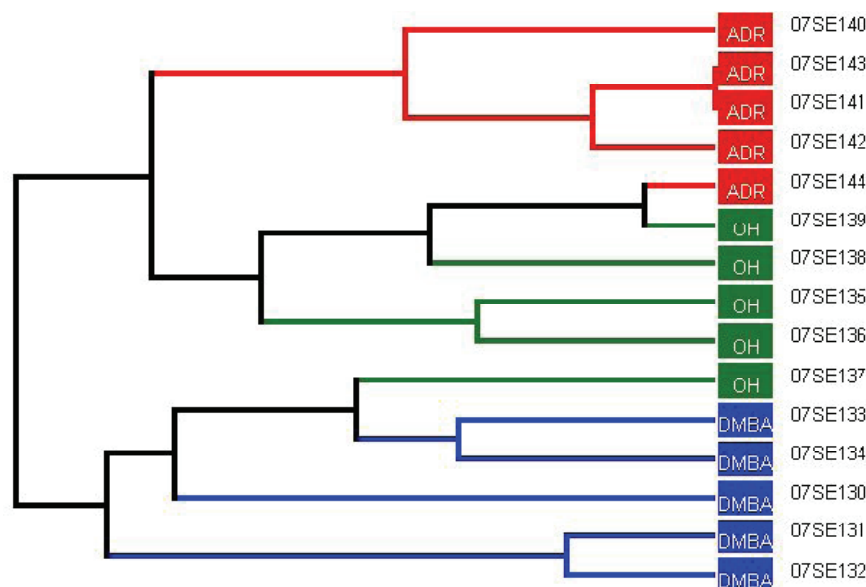


Figura 23. Clúster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de la lista de genes $P < 0.05$ ADR vs HT vs DMBA Final (16 genes). Ensayo RTPCR. En las cuadrículas se codifican en azul, rojo o verde las muestras de cada condición. DMBA: grupo control de cáncer de mama, OH: grupo tratado con hidroxitirosol (HT), ADR: grupo tratado con adriamicina.

VII.2.- SECUENCIAS SELECCIONADAS EN CADA GRUPO DE ESTUDIO.

A continuación se detallan los valores de expresión y significación estadística de aquellas secuencias validadas en cada uno de los grupos tras la comparación Final vs Inicio, así como los datos previamente obtenidos para cada uno en el análisis microarray.

La **Tabla 19** representa los genes del grupo HT, su expresión y significación estadística obtenidos en el estudio de RTPCR y en el de microarray, en comparación con DMBA y ADR. De estos genes, IER3 (immediate early response 3) y NHN1 (conserved nuclear protein Nhn1) han sido validados tanto para HT como para ADR, presentando unos niveles de expresión muy similares. Por su parte PER2 [period homolog 2 (Drosophila)] ha sido igualmente validado para HT y DMBA, con unos valores de expresión semejantes. CCNL2 (cyclin L2) se valida en los tres grupos con una expresión parecida. Evidentemente estos dos casos se repiten en las comparaciones correspondientes de los grupos ADR y DMBA, razón por la cual no se volverá a indicar. El resto de secuencias no fueron validadas en los grupos DMBA y ADR, apareciendo sólo el cambio

de expresión que mostraron en el microarray, y en algunos también la significación en dicho análisis.

Tabla 19. Valores de expresión de los genes validados en el grupo hidroxitirosol comparados con DMBA y adriamicina.

	HT				DMBA				ADR			
	Microarray		RTPCR		Microarray		RTPCR		Microarray		RTPCR	
	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P
IER3	0.53	0.0077	0.51	0.0005	0.70				0.64	0.0437	0.7	0.1477
PER2	0.48	0.0004	0.53	0.0013	0.40	0.00792	0.37	0.0037	0.47			
SNF1LK	0.73	0.0094	0.67	0.0036	0.67				1.45			
CCNL2	0.68	0.0048	0.50	0.0046	0.70	0.0204	0.62	0.0084	0.67	0.0491	0.5	0.0043
SFRP4	6.54	0.0085	12.51	0.0065	2.55				1.28			
TNFRSF6	1.62	0.0018	1.64	0.0111	1.33				1.41			
CDKN2A	2.39	0.0476	2.54	0.0138	1.79				1.48			
CRYAB	2.03	0.0046	2.40	0.0161	1.04				1.22			
FADS1	0.77	0.0042	0.87	0.0184	1.18				0.81			
CNKSR1	0.73	0.0069	0.67	0.0207	0.91				0.92			
CDC42	1.11	0.0100	1.16	0.0250	1.08				0.93			
CABC1	1.78	0.0133	1.71	0.0262	0.88				1.20			
APBB3	0.61	0.0363	0.49	0.0331	0.67				0.77			
JUNB	0.77	0.0308	0.56	0.0334	0.95				0.86			
CAR11	0.70	0.0125	0.55	0.0337	0.76				1.05			
JUN	0.60	0.0047	0.48	0.0337	0.93				0.81			
IL6ST	1.39	0.0485	1.57	0.0373	0.90				1.27			
CPT1A	1.18	0.0474	1.40	0.0375	1.19				1.08			
NHN1	3.24	0.0178	0.86	0.0422	1.71				3.03	0.0077	0.8	0.0334

FC. Fold change o Cambio de expresión.

Las secuencias se muestran ordenadas según su nivel de significación estadística ($P < 0.05$) en el grupo de referencia HT, además de mostrarse su cambio de expresión.

La **Figura 24** muestra esquemáticamente las comparaciones entre las expresiones (aumentada o reprimida) obtenidas mediante microarray para cada uno de los genes validados en el grupo HT. Se puede comprobar cómo, salvo alguna excepción (SFRP4 y NHN1), los niveles de expresión detectados por microarray fueron confirmados de manera muy similar mediante RTPCR. La expresión de SFRP4 estuvo altamente infravalorada en el estudio de microarray, mientras que NHN1 fue considerada al

contrario. En general, la validación muestra una acentuación de las expresiones al alza o a la baja según el caso.

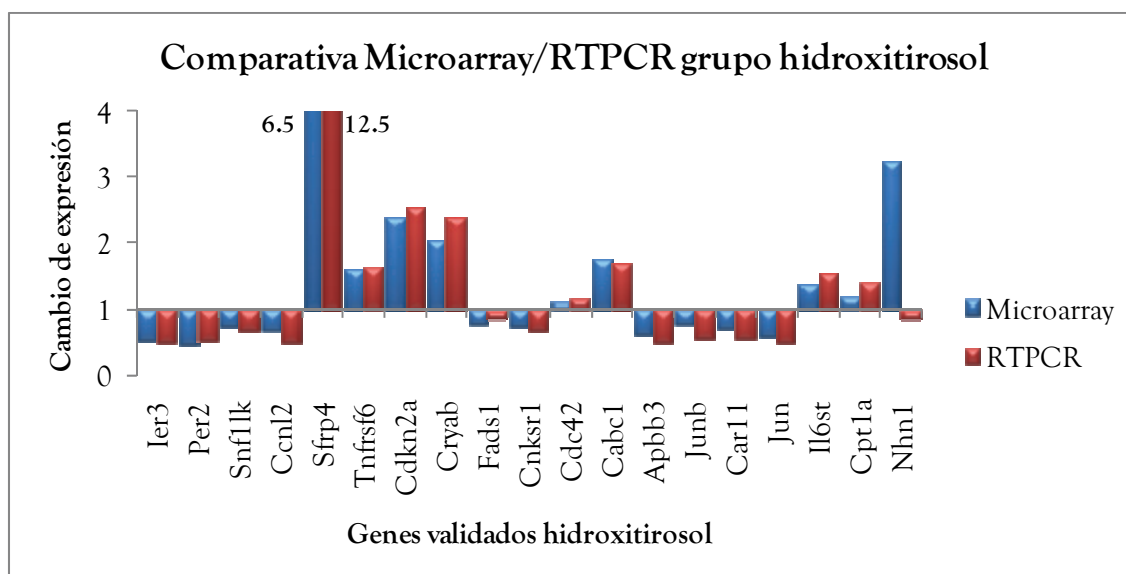


Figura 24. Estudio comparativo de los niveles de expresión detectados por microarray y confirmados usando RTPCR en el grupo hidroxitirosol. Las barras hacia arriba indican sobreexpresión; las barras dirigidas hacia abajo representan represión. Para estudiar con detalle los valores véase la *Tabla 19*.

La *Tabla 20* representa los genes del grupo DMBA, su expresión y significación estadística obtenidos en el estudio de RTPCR y en el de microarray, en comparación con HT y ADR. De estos genes, TEF (thyrotroph embryonic factor) es validado tanto para DMBA como para ADR, presentando unos niveles de expresión muy similares. RNPS1 (Ribonucleic acid binding protein S1) se valida en los tres grupos, aunque es en el de DMBA donde tiene el menor nivel de expresión, seguido de HT y ADR. El resto de secuencias no se validan en los grupos HT y ADR, apareciendo sólo el cambio de expresión que tienen en el microarray, y en algunos también la significación en dicho análisis.

Tabla 20. Valores de expresión de los genes validados en el grupo DMBA comparados con los de los grupos hidroxitirosol y adriamicina.

	DMBA				HT				ADR			
	Microarray		RTPCR		Microarray		RTPCR		Microarray		RTPCR	
	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P
SLC6A4	0.66	0.0079	0.54	0.0018	0.81				0.78			
PER2	0.40	0.0079	0.37	0.0037	0.48	0.0004	0.53	0.0013	0.47			
TEF	0.66	0.0078	0.48	0.0049	0.77				0.60	0.0112	0.52	0.0236
CCNL2	0.70	0.0204	0.62	0.0084	0.68	0.0048	0.50	0.0046	0.67	0.0491	0.50	0.0043
MYH9	0.74	0.0212	0.68	0.0107	1.04				0.63			
TPSAB1	0.38	0.0188	0.30	0.0120	0.57				0.81			
NNAT	0.65	0.0223	0.56	0.0144	0.78				0.81			
NEXN	0.80	0.0234	0.58	0.0147	1.60	0.0475			1.36			
PCDHA4	1.51	0.0156	2.30	0.0174	1.08				0.92			
PGR	0.37	0.0158	0.41	0.0190	0.70				0.92			
ANGPTL4	2.17	0.0457	2.14	0.0190	1.23				1.45			
GABBR1	0.63	0.0329	0.49	0.0201	0.80				0.74			
CMA1	0.44	0.0095	0.45	0.0208	1.06				0.82			
MAX	0.71	0.0483	0.76	0.0218	0.86				0.75			
ID1	2.08	0.0178	2.17	0.0239	1.30				0.90			
LTC4S	1.78	0.0332	1.76	0.0256	1.15				1.31			
BTC	0.43	0.0440	0.33	0.0288	0.71				1.30			
MCA32	0.59	0.0251	0.60	0.0442	0.69				0.94			
S100A9	3.03	0.0329	2.84	0.0466	1.72				0.39			
RNPS1	0.51	0.0287	0.85	0.048	0.46	0.0028	0.93	0.3416	0.56	0.0488	1.04	0.6727

FC. Fold change o Cambio de expresión.

Las secuencias se muestran ordenadas según su nivel de significación estadística ($P < 0.05$) en el grupo de referencia DMBA, además de mostrarse su cambio de expresión.

La **Figura 25** muestra esquemáticamente las comparaciones entre las expresiones (aumentada o reprimida) obtenidas mediante microarray para cada uno de los genes validados en el grupo DMBA. Se puede apreciar cómo los niveles de expresión detectados por microarray se confirmaron de manera muy similar mediante RTPCR, mostrando en general que la validación acentuó las expresiones al alza o a la baja según el caso.

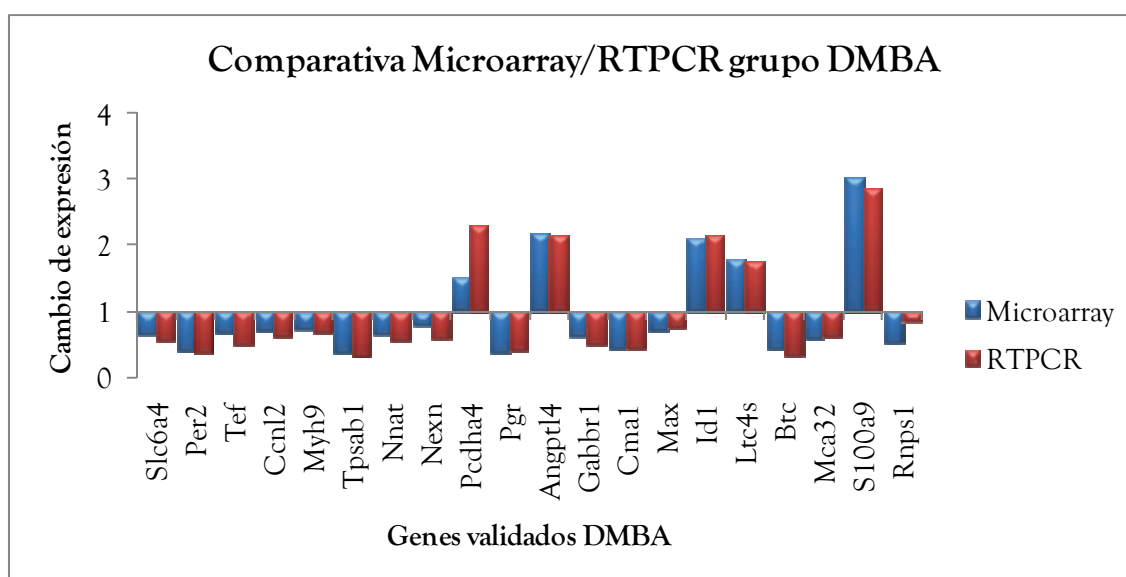


Figura 25. Estudio comparativo de los niveles de expresión detectados por microarray y confirmados usando RTPCR en el grupo DMBA. Las barras hacia arriba indican sobreexpresión; las barras dirigidas hacia abajo representan represión. Para estudiar con detalle los valores véase la **Tabla 20**.

La **Tabla 21** representa los genes del grupo ADR, su expresión y significación estadística obtenidos en el estudio de RTPCR y en el de microarray, en comparación con HT y DMBA. Exceptuando los genes CCLN2, TEF y NHN1, el resto de secuencias no se validan en los grupos HT y DMBA, apareciendo sólo el cambio de expresión que tienen en el microarray, y en algunos también la significación en dicho análisis.

Tabla 21. Valores de expresión de los genes validados en el grupo de adriamicina comparado con los grupos hidroxitirosol y DMBA.

	ADR				HT				DMBA			
	Microarray		RTPCR		Microarray		RTPCR		Microarray		RTPCR	
	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P	FC	Valor P
GIT2	0.51	0.0083	0.76	0.0004	0.66				0.74			
NPY	0.19	0.0033	0.10	0.0010	0.87				1.83			
CDC25B	0.26	0.0008	0.27	0.0038	0.96				1.15			
CCNL2	0.67	0.0491	0.50	0.0043	0.68	0.0048	0.50	0.0046	0.70	0.0204	0.62	0.0084
HBB	0.21	0.0157	0.05	0.0087	1.08				1.41			
HBA-A1	0.31	0.0265	0.07	0.0138	1.09				1.41			
GCLC	0.75	0.0296	0.69	0.0150	0.76				0.84			
TEF	0.60	0.0112	0.52	0.0236	0.77				0.66	0.0078	0.48	0.0049
GLOA	0.13	0.0194	0.12	0.0254	1.11				1.53			

<i>(Continuación Tabla 21).</i>										
ADRA2A	2.03	0.0361	2.89	0.0288	1.37					1.57
SGCG	4.78	0.0104	3.54	0.0306	1.21					1.55
SQLE	0.74	0.0380	0.64	0.0314	0.93					1.06
LIMK2	0.45	0.0350	0.83	0.0325	1.08					1.08
NHN1	0.45	0.0077	0.77	0.0334	3.24	0.0178	0.86	0.0422		1.71
THRSP	5.02	0.0301	5.17	0.0349	1.43					1.04
OGFRL1	1.45	0.0384	1.30	0.0350	1.01					1.47
ALAS2	0.11	0.0150	0.05	0.0370	1.47					1.72
EGR3	0.53	0.0312	0.46	0.0490	0.78					1.24
FC. <i>Fold change</i> o Cambio de expresión.										

Las secuencias se muestran ordenadas según su nivel de significación estadística ($P < 0.05$) en el grupo de referencia ADR, además de mostrarse su cambio de expresión.

La *Figura 26* muestra esquemáticamente las comparaciones entre las expresiones (aumentada o reprimida) obtenidas mediante microarray para cada uno de los genes validados en el grupo ADR. Se puede comprobar cómo los niveles de expresión detectados por microarray se confirmaron de manera muy similar mediante RTPCR. Además se muestra que la validación, en general, acentuó las expresiones al alza o a la baja según el caso.

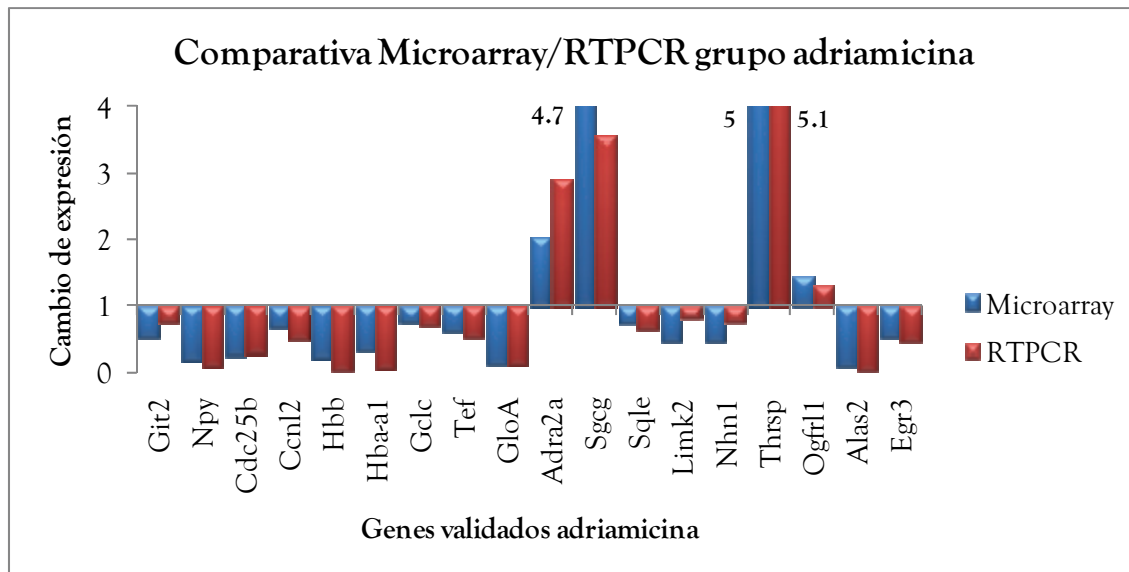


Figura 26. Estudio comparativo de los niveles de expresión detectados por microarray y confirmados usando RTPCR en el grupo adriamicina. Las barras hacia arriba indican sobreexpresión; las barras dirigidas hacia abajo representan represión. Para estudiar en detalle los valores véase la *Tabla 21*.



Discusión

I.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS.

Es ampliamente conocida la capacidad que tiene la adriamicina de alterar el perfil lipídico en ratas, aumentando los niveles plasmáticos de lípidos totales, triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en plasma y en órganos como el hígado, corazón, riñón e incluso testículos (Deepa y Varalakshmi, 2005; Abd-Ellah y Mariee, 2007; Subashini y *col.*, 2007; Zanetti y *col.*, 2007). Este aspecto apoya los resultados obtenidos en el presente estudio en relación al marcado aumento en el perfil lipídico plasmático para el grupo tratado con ADR.

Por su parte el HT no comparte con la ADR el efecto anterior sobre los lípidos, siendo muy similares los resultados a los del grupo control sano. Es interesante ver cómo la media de los niveles de colesterol fue menor en el grupo de HT con respecto a la observada en el grupo control sano, aunque no de modo significativo. En otros estudios se ha descrito de forma previa un efecto hipocolesterolemizante y reductor de triglicéridos por parte del hidroxitirosol (Fki y *col.*, 2007; Jemai y *col.*, 2008a; Jemai y *col.*, 2008b). La ausencia de una reducción significativa en el colesterol y triglicéridos en nuestro estudio puede deberse a que la dosis y duración del tratamiento en nuestro caso fueron mucho menores que las utilizadas por los anteriores autores (2.5 y 5; 3 mg/kg respectivamente, durante 16 semanas). Por otra parte, la combinación de hidroxitirosol con adriamicina no disminuyó el incremento lipídico provocado por la antraciclina, lo cual era de esperar a la vista de una falta de efecto en el grupo de HT sólo.

II.- INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.

El ensayo comet para determinar los niveles de genotoxicidad muestra que el hidroxitirosol no disminuyó de forma significativa el % de ADN dañado en linfocitos de sangre periférica en comparación con el grupo tratado con ADR. Además, la combinación de HT con ADR no redujo el daño comparado con ADR y DMBA de forma significativa. No obstante, las tendencias para los grupos HT y ADR+HT fueron a la reducción de la tasa de daño. Que no haya una disminución significativa puede ser debido a que la dosis usada en el estudio sea baja, que como ha sido comentado para el

caso de los lípidos, actualmente se usan dosis mucho más elevadas que la nuestra en estudios con ratas (Fki y col., 2007; Jemai y col., 2008a; Jemai y col., 2008b). Esta misma razón podría explicar porqué no se produjo un aumento significativo de la capacidad antioxidante en el grupo HT en comparación con el resto.

En cuanto a los niveles de vitaminas liposolubles antioxidantes en plasma, el tocoferol se encontró muy aumentado por acción de la adriamicina. Resultado que está de acuerdo con el hecho de que este fármaco incrementa los niveles de vitamina E en plasma de ratas (Danelisen y col., 2002). Esto podría producirse como consecuencia de una alta movilización de los depósitos hepáticos (Warren y col., 1991), a diferencia de lo que ocurre con el HT y el grupo control con DMBA. Otra posible explicación reside en el hecho de que el tocoferol es de naturaleza lipídica y como se destacó en el apartado anterior, la ADR generó un aumento significativo de los lípidos plasmáticos.

Los efectos de la adriamicina quedan también patentes con la disminución que ocasiona sobre los niveles de coenzima Q, que cómo es bien conocido ocasiona una depleción a nivel plasmático (Quiles y col., 2002c). En nuestro estudio se hace imprescindible expresar los datos en función del contenido lipídico, ya que los grupos ADR y ADR+HT los tuvieron muy aumentados. Si no se hace esto, se observan datos tan extraños cómo los mayores niveles de coenzima Q₉ en aquellas ratas tratadas con la antraciclina, lo que estaría en desacuerdo con lo anteriormente expuesto. Sin embargo, este mismo coenzima expresado en función de los lípidos, muestra que realmente los grupos ADR y ADR+HT son los que menos coenzima Q₉ tienen, aunque los valores no sean estadísticamente significativos. No obstante, para el coenzima Q₁₀ sí que se hallaron valores significativamente más bajos, aunque parece que el HT tiende a normalizar los niveles de este coenzima en el plasma de las ratas ADR+HT. Hay que destacar que los niveles plasmáticos de coenzima Q₉ son superiores a los de Q₁₀ porque en ratas es mayoritario el primero (Quiles y col., 2002c).

III.- CUANTIFICACIÓN PLASMÁTICA DE HIDROXITIRO SOL Y ALCOHOL HOMOVANÍLICO.

La mayor presencia de hidroxitiro sol en el plasma de los animales pertenecientes al grupo HT con respecto a los de ADR+HT, indica que la tasa de metabolización fue superior en las ratas de este último grupo. Esto podría deberse al aumento de los sistemas de detoxificación del organismo como consecuencia de la presencia de adriamicina (Berthiaume y Wallace, 2007). Lo anterior explicaría por qué los niveles de hidroxitiro sol fueron inferiores en el grupo ADR+HT, que no tendrían elevados estos sistemas de eliminación de tóxicos, y por tanto no se vería acelerado el metabolismo del HT.

Si el metabolismo está incrementado en el grupo ADR+HT, lo normal sería hallar mayores niveles de metabolitos. Sin embargo, lo anterior no fue hallado en relación al alcohol homovanílico, cuya baja presencia podría explicarse teniendo en cuenta los resultados de Miro-Casas y colaboradores. Estos autores describen que a las 8 horas tras la administración de 25ml de aceite de oliva, los niveles de este metabolito del HT alcanzan en algunos casos concentraciones similares al límite de cuantificación (Miro-Casas y col., 2003).

Además de lo anterior, habría que tener en cuenta que la última administración de HT en nuestros animales se hizo como mínimo 24 horas antes del sacrificio. Los estudios de determinación de hidroxitiro sol y sus metabolitos, se llevan a cabo en plasma de sangre recogida minutos después de la administración del compuesto. La tesis doctoral realizada por González-Santiago muestra en un estudio de absorción realizado en ratas con 25 μ moles de HT la presencia de este compuesto y sus derivados a los 5 minutos tras su administración. La administración de una solución acuosa de 2.5mg/kg de HT a humanos produjo un aumento de las concentraciones plasmáticas de HT y AH inmediatamente después de su consumo (González-Santiago, 2005). Esta razón podría explicar las bajas cantidades encontradas para ambos compuestos en el plasma de nuestros animales.

IV.- EFECTOS DEL HIDROXITIRO SOL SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL.

El trabajo expuesto en la presente memoria de tesis doctoral muestra por primera vez los efectos antitumorales del HT, testados sobre ratas hembra con cáncer de mama. A su vez, y con el fin de determinar si dicho antioxidante afecta en cierto modo las virtudes anticancerígenas de la ADR y sus efectos secundarios, se han estudiado los posibles efectos de la combinación ADR+HT.

El HT fue capaz de retener el crecimiento de los tumores mamarios de las ratas. Se pudo observar que, tanto a nivel de tumor truncut cómo del total de carcinomas, el volumen no aumentó cómo en el caso del grupo DMBA, llegando incluso a poder compararse el volumen tumoral total con el presentado por los grupos ADR y ADR+HT. Cómo hemos indicado más arriba, es la primera vez que se describe en animales los efectos antiproliferativos del HT, los cuales ya habían sido ampliamente estudiados en líneas de células tumorales (Della Ragione y *col.*, 2002; Guichard y *col.*, 2006; Corona y *col.*, 2007; Cornwell y Ma, 2008; Fabiani y *col.*, 2008a; Hashim y *col.*, 2008; Menendez y *col.*, 2008).

Además, en el presente estudio se ha podido comprobar que la combinación ADR+HT no afecta en modo alguno la capacidad antitumoral de la antraciclina. Este aspecto se ha probado aquí por primera vez ya que, hasta donde nosotros sabemos, no existe ningún trabajo científico previamente publicado al respecto. Además apoya lo que Ozben respalda, y es que la combinación con doxorrubicina de una sustancia antioxidante con propiedades antiproliferativas propias no debe disminuir la capacidad antitumoral de la antraciclina, cómo mínimo no afectarla o incluso sinergizar (Ozben, 2007). En nuestro estudio se puede observar que el HT parece aumentar la capacidad antitumoral de la ADR, ya que se trata del único grupo que no varió de forma significativa el volumen tumoral total del momento basal al final.

Los efectos que se han comentado en los párrafos anteriores en relación al volumen tumoral, se ven apoyados con la capacidad antiproliferativa que el hydroxytyrosol ha

demostrado en nuestro estudio a la vista de la baja presencia de Ki67. Por otro lado, se ha visto que es totalmente comparable a la que ejerce la doxorrubicina. Mientras el volumen tumoral total muestra que la combinación ADR+HT podría presentar un efecto sinérgico, la proliferación no describe tal efecto. Esto es así ya que la inmunotinción de Ki67 que se ha llevado a cabo en los tumores biopsiados, mostró un comportamiento similar al observado en el grupo ADR. Por tanto, para el grupo ADR+HT no debería haber diferencias llamativas con respecto a los demás grupos tratados. Siendo esto así, ¿cómo puede ser que el HT presente un mayor volumen no significativo del tumor trucut y un % de Ki67 prácticamente igual que ADR y ADR+HT?. Esto podría explicarse por la presencia de tumores con abundante secreción, de mayor tamaño pero con una proliferación celular reducida por el HT. Estos resultados no han podido ser apoyados por otros trabajos científicos, dada la inexistencia de referencias al respecto.

Por su parte, el tratamiento con ADR implicó una pérdida de peso corporal apreciable, además de una menor ingesta calórica, lo cual concuerda con lo descrito en numerosos estudios en ratas (Panjra y col., 2007; Santos y col., 2007; Xin y col., 2007; Zanetti y col., 2007). Esta es la razón que podría explicar que en nuestro estudio los pesos de los animales tratados con ADR, sola, o en combinación con el HT, tengan los niveles de peso más bajos. Sin embargo, tal disminución no es estadísticamente significativa con respecto al grupo HT, que mantuvo el nivel cercano al grupo DMBA, lo que indica que el antioxidante no genera una pérdida de peso significativa tras su tratamiento. Además, junto al grupo control DMBA, el tratado con hidroxitirosol tuvo un peso significativamente superior al final del tratamiento. Esto indica que los animales incrementaron su peso incluso con la toma de hidroxitirosol, tal como ocurría en aquellos sin tratamiento.

Desde el punto de vista histopatológico, los tumores mamarios inducidos con DMBA de nuestro trabajo presentaron unas características histopatológicas que están de acuerdo con los resultados obtenidos por Costa y colaboradores (Costa y col., 2002), donde el patrón cribiforme y los grados I y II son los predominantes del modelo (Russo y Russo, 2000). Ni la ADR ni el HT combinado o no con la antraciclina evitaron por completo el progreso de los tumores hacia grados superiores y otros patrones arquitecturales, aunque

sí lo disminuyen visiblemente. Concretamente, el HT parece ser el compuesto que menos promueve el aumento del grado de Bloom-Richardson con el paso del tiempo, e incluso en combinación con la ADR favoreció la disminución con respecto a la antraciclina sola. La ausencia de datos en la literatura en relación a los efectos del HT y su combinación con la ADR desde el punto de vista anatomopatológico, refuerza la originalidad del presente estudio.

V.- ESTUDIO DE PERFIL GÉNICO: GENES VALIDADOS MEDIANTE RTPCR.

A continuación se discuten aquellos genes procedentes del análisis microarray cuya expresión ha sido confirmada mediante el correspondiente estudio de RTPCR, para cada grupo analizado (HT, ADR y DMBA) (Véanse: Tablas 19, 20 y 21. Resultados. Apartado VII.2.).

V.1.- GENES VALIDADOS EN EL GRUPO HIDROXITIRO SOL.

El hidroxitiro sol favorece la apoptosis a través de la represión de IER3 antiapoptótico.

La expresión del gen IER3 (immediate early response 3) codifica una proteína asociada con la progresión del ciclo celular y la proliferación. Además se ha visto que puede regular la apoptosis actuando cómo pro o antiapoptótico en función del tipo de célula, estímulo y localización celular (Hamelin y col., 2006; Shen y col., 2006; Arlt y col., 2008).

Bajo condiciones de crecimiento inapropiado tales como activación de receptor muerte, daños graves al ADN, privación sérica, o situaciones de estrés oxidativo generadas por ERO que pueden ser causadas por agentes cómo la adriamicina o derivados de benzopireno (Arlt y col., 2001; Wu, 2003; Semlali y col., 2004; Sarkar y col., 2008), se previene la activación de ERK (extracellular regulated MAP kinase). Además de producirse la activación de NF κ B con el fin de inhibir la apoptosis tras la transcripción de proteínas antiapoptóticas cómo Bcl-2 o Bcl-x (mecanismo que implica a dicho factor de



transcripción en el desarrollo del cáncer). Como parte de un mecanismo contra regulatorio y autodestructivo, tanto NF κ B como las proteínas antiapoptóticas mencionadas son capaces de activar la expresión de IER3 proapoptótico (*Figura 1. Ier3*) que se trasloca al núcleo inactivando a NF κ B (*Figura 1. NF κ B*) e iniciándose la apoptosis.

Esta situación ha sido puesta de manifiesto por los estudios realizados por Segev y colaboradores usando la sustancia inhibidora del conducto Mülleriano. Dichos trabajos describen la sobreexpresión de IER3 que inactiva a NF κ B y bloquea el crecimiento de células de cáncer de mama MDA-MB-231, T47D y MCF10A (Segev y col., 2000; Segev y col., 2001). El mecanismo estaría relacionado con la reducción en la degradación del inhibidor de NF κ B (Arlt y col., 2003) y la interacción directa de IER3 con Rel-A/p65-NF κ B en el núcleo de células HeLa y PT45-P1 (Arlt y col., 2008).

Cómo se ha indicado en varias ocasiones en la presente memoria de tesis, el hidroxitirosol es un potente antioxidante con alta capacidad para eliminar ERO. Por tanto sería lógico pensar que dicho compuesto prevenga la activación de NF κ B, cómo demuestra Guichard y colaboradores en células de carcinoma de colon (Guichard y col., 2006). Además el HT tiene la capacidad de generar aductos arilantes/alquilantes en el residuo de cisteína de este factor de transcripción, mediado por los derivados catecol quinonas del HT, lo que lo imposibilita para iniciar la transcripción (Cornwell y Ma, 2008). Estas premisas nos llevan a pensar que en el grupo HT, NF κ B no activa la expresión de IER3 proapoptótico. Nuestros resultados muestran que tras el tratamiento con HT disminuyen los niveles iniciales de expresión de este gen, mostrando quizá la reducción de la necesidad por combatir un estrés por parte de la célula.

Sin embargo, en situaciones de crecimiento favorables la proteína codificada por este gen actúa cómo antiapoptótica promoviendo la supervivencia celular (Arlt y col., 2008). En nuestro estudio se demuestra la fuerte inhibición de la expresión de este gen tras el tratamiento con HT (FC: 0.51; $P=0.0005$. Estudio de RTPCR). Se podría hablar de una menor cantidad de proteína IER3 antiapoptótica (*Figura 1. Ier3*), situación que favorecería la muerte celular, al igual que sucede en el grupo ADR.

García y colaboradores indican que para que lo anterior ocurra, es absolutamente necesaria la presencia de al menos una ERK activa en la célula, lo que supone que está en disposición favorable para crecer. Si esto no es así (cómo por ejemplo por la existencia de NFκβ activo), no se inicia MAPK (mitogen activated protein kinase) y no se produce la expresión de IER3 cómo antiapoptótico (García y col., 2002). Puesto que se trata de tejido tumoral, hay que tener en cuenta que se supone una situación de crecimiento favorable, por lo que habrá ERK activas ya que el HT no permite la acción de NFκβ, por lo que éste no puede inactivar a estas quinasas. Un ejemplo de que el HT no altera la señal mitogénica es CDC42 (cell division cycle 42), una pequeña GTP-asa comúnmente sobreexpresada en cáncer de mama y que el HT no parece modificar. De este modo se podría estar activando a MAPK tras actuar sobre ERK (Tang y col., 2008). No cabría esperar lo mismo de Ras puesto que cómo vimos anteriormente en los antecedentes bibliográficos de esta memoria, el modelo de DMBA es muy independiente de este oncogén. Sin embargo con nuestro modelo no podemos asegurar que la expresión esté inhibida en comparación con un tejido sano. Sólo podemos ver que no se produce una alteración excesiva en la expresión de una pequeña GTP-asa de Ras, CNKSR1 (connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1), sin embargo, el HT parece ser el que más reduce la transcripción tras el tratamiento y por tanto la señalización oncogénica de Ras, lo que ayudaría a la supresión tumoral (Douziech y col., 2006; Tang y col., 2008).

Además, IER3 modula la actividad de la ruta de señalización AKT (*Figura 1.* ) implicada en la proliferación, progresión del ciclo e inhibición de la apoptosis celular. La razón es que en respuesta a factores de crecimiento cómo PI3K, IER3 prolonga la activación de AKT al bloquear a su inhibidor PP2A (*Figura 1.* ) una fosfatasa serina/treonina. Este bloqueo de PP2A es consecuencia del incremento que IER3 produce en la señalización de ERK cómo parte de un sistema de retroalimentación positiva, favoreciéndose el proceso carcinogénico. Esto corrobora la aumentada presencia de IER3 en muchas células tumorales en comparación con tejidos sanos (Rocher y col., 2007) y en diversos carcinomas mamarios, aumentando la invasividad en cánceres estrógeno dependientes (Yang y col., 2006).

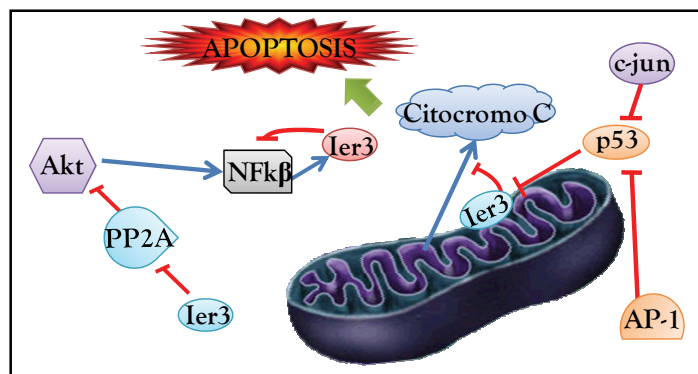
Por otra parte, se ha demostrado que el hidroxitirosol favorece la apoptosis de células HT29 al activar la acción de PP2A (Guichard y *col.*, 2006). Por tanto, si se mantiene la idea de una expresión reducida de IER3 como inhibidor de la apoptosis tras el tratamiento con HT con respecto al pretratamiento, significaría que no hay suficiente proteína para bloquear a PP2A. De este modo se favorece su acción bloqueante sobre AKT, promoviendo la apoptosis y corroborando de este modo el resultado de Guichard y colaboradores. Aspecto que además se ve potenciado si reducimos la expresión de AKT, cómo hemos constatado mediante un estudio de RTPCR que forma parte de futuras investigaciones y que queda fuera del presente trabajo, mostrando que el HT disminuye la expresión de AKT tras el tratamiento (Expresión de 0.6; $P=0.0027$). Este resultado también está de acuerdo con los resultados obtenidos por Guichard y colaboradores, lo que indica que se favorece la apoptosis en detrimento de la proliferación celular, constituyendo una importante baza en el poder antitumoral del HT.

Una de las acciones que IER3 ejerce para impedir la apoptosis es el bloqueo de la liberación mitocondrial de citocromo c (Garcia y *col.*, 2002; Shen y *col.*, 2006). Si se mantiene la hipótesis de que el HT disminuye la expresión de este gen cómo antiapoptótico, se facilitaría la liberación de citocromo c y se favorecería la apoptosis. Resultado que estaría de acuerdo con los estudios realizados en diversas líneas celulares en las que este antioxidante promueve la apoptosis dependiente de la liberación de citocromo c (Della Ragione y *col.*, 2000; Guichard y *col.*, 2006). Por otro lado, IER3 juega un papel importante en la resistencia celular a la apoptosis inducida por $TNF\alpha$ y FAS (Wu y *col.*, 1998; Garcia y *col.*, 2002). Teniendo en cuenta esto, la menor expresión inducida por el HT facilitaría la muerte celular vía FAS (Tnfrsf6 o TNF receptor superfamily, member 6, también conocido como FAS), ya que en nuestro estudio de validación se ve aumentada la expresión de este receptor (FC: 1.64; $P=0.0111$. Estudio de RTPCR).

Un estudio sobre la resistencia al tamoxifeno en células MCF-7 ha mostrado ambas facetas moduladoras de la apoptosis de IER3. De tal manera, que a corto plazo, el tamoxifeno estimulaba la expresión de este gen cómo proapoptótico dependiente de $NF\kappa\beta$, induciendo la muerte. No obstante, tras un tratamiento prolongado se activó su

función antiapoptótica mediada por ERK, permitiendo el crecimiento en presencia del fármaco (Semlali y col., 2004). Esto hace pensar que el HT podría ser capaz de disminuir la resistencia creada en tratamientos con tamoxifeno de tumores de mama estrógeno dependientes. En el presente trabajo, el HT podría estar actuando en este sentido, ya que aunque no se ha encontrado la expresión de los receptores de estrógeno, probablemente debido a la variabilidad en las muestras (cómo indica la ausencia de agrupación jerárquica en el microarray), la menor expresión de c-jun (jun onogene) que el HT origina tras el tratamiento reduce el bloqueo que este oncogén ejerce sobre los receptores estrogénicos (Shen y Brown, 2003). Además, si el gen IL6ST (interleukine 6 signal transducer) cuya sobreexpresión ha sido validada para el HT (FC: 1.57; $P=0.0373$) se correlaciona directamente con la presencia de ER α (receptor de estrógenos alfa), se puede deducir que éstos receptores también podrán estar aumentados, impidiendo la resistencia al tamoxifeno.

La hipótesis planteada para el gen IER3 es que se podría ver expresado en el momento inicial cómo proapoptótico dependiente de NF κ B. Esto, sería consecuencia del estrés oxidativo generado por el carcinógeno, posible hipoxia intratumoral y cómo parte de la activación de este factor de transcripción en su papel de desarrollo del cáncer. Sin embargo, la eliminación de ERO y la acción de las formas catecol quinonas del antioxidante favorecería la inactivación de la ruta antiapoptótica de NF κ B. Este hecho facilitaría la acción de ERK sobre IER3 antiapoptótico destinado al crecimiento tumoral. El mecanismo por el cual el HT disminuye la expresión de IER3 será posteriormente estudiado, pero podría estar relacionado con la capacidad que este antioxidante tiene de reducir la expresión de factores de transcripción cómo AP-1 (*Figura 1. AP-1*) o la expresión de supresores tumorales cómo p53 (*Figura 1. p53*). Esto inhibe la transcripción de IER3 antiapoptótico, ya que se ha visto en muchas líneas celulares tumorales esta proteína sobreexpresada cómo consecuencia de la inactivación de p53, predisponiendo a la tumorigénesis (Wu, 2003).



El hidroxitirosol bloquea la ruta de supervivencia Wnt al aumentar la expresión de SFRP4.

Otro de los genes cuya expresión ha resultado modificada tras el tratamiento con HT (FC: 12.51; $P=0.0065$. Estudio de RTPCR) es el que codifica una proteína antagonista de la ruta Wnt conocida como SFRP4 (Secreted Frizzled-Related Protein 4) (*Figura 1. SFRP4*). La vía de señalización Wnt es una ruta esencial que regula la proliferación, morfología, migración, apoptosis o diferenciación celular. Incluye dos vías: canónica y no canónica. La vía canónica es aquella en la que están implicados los clásicos Wnt (Wnt1, Wnt3, Wnt8, Wnt8b), que al unirse a los receptores Frizzled, conduce a la activación corriente abajo de la transcripción de genes mediado por β -catenina, previamente liberada de su unión con Axina y GSK-3 β (que la mantienen desestabilizada, inactiva y lista para su degradación). La vía no canónica, es independiente de β -catenina, y puede estar mediada por tres posibles mecanismos: flujo de Ca²⁺, proteínas G y el mediado por JNK. Hay una serie de mecanismos que promueven la inactivación de la ruta Wnt, entre ellos: destrucción del complejo multiproteico β -catenina y la degradación por proteosoma de ésta, secreción de factores antagonistas (Dickkopf-1, factor inhibidor de Wnt 1 o Wif-1, y las proteínas secretadas relacionadas con frizzled, SFRPs), co-represión transcripcional que silencia los genes diana (correpresores de Groucho/TLE y CtBP) y modificaciones postraslacionales (Taipale y Beachy, 2001; Kawano y Kypta, 2003; Karim y col., 2004; Turashvili y col., 2006; Shi y col., 2007).

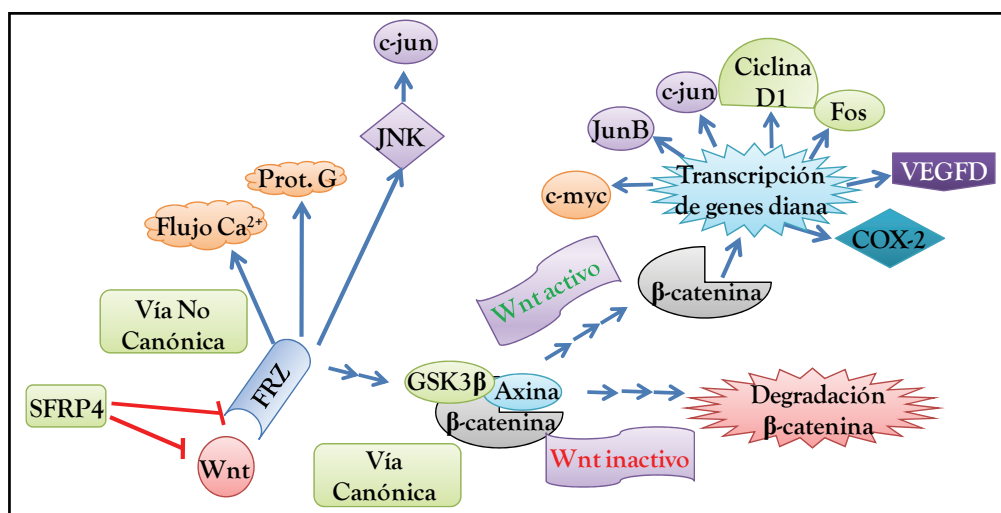
La familia de proteínas SFRPs puede actuar directamente sobre las diferentes proteínas Wnt y antagonizar la señalización de la ruta, previniendo la interacción con los receptores Frizzled, o bien, actuar directamente sobre estos receptores y formar complejos

activos con los mismos, inactivando las vías canónica y no canónica. Se han postulado cómo supresores tumorales, ya que son inhibidos epigenéticamente en varios tipos de cánceres por hipermetilación de sus promotores (Kawano y Kypta, 2003; Karim y col., 2004). El gen SFRP4 guarda relación con procesos apoptóticos fisiológicos, donde es más un estímulo de apoptosis que una consecuencia de la misma (involución mamaria, ovulación, etc.) (Drake y col., 2003; Lacher y col., 2003). En tumores humanos (próstata, mesotelioma, etc.) inhibe la proliferación de las células tumorales (He y col., 2005; Horvath y col., 2007). No obstante, los miembros de esta familia presentan efectos contradictorios, así por ejemplo, dos miembros muy estudiados cómo supresores tumorales (SFRP1 y 2) son capaces de activar la ruta Wnt, mientras que SFRP4 se ha visto sobreexpresado en tumores mamarios invasivos, de endometrio, próstata o colon-recto. No se conoce aún bajo qué circunstancias se producen estos efectos contradictorios. Sin embargo se ha postulado que podría ser debido a los diferentes ligandos Wnt presentes en la célula, respuestas específicas del tejido a diferentes estímulos, respuestas bifásicas en función de la distinta afinidad y especificidad por Wnt, o bien debido a la concentración. En este sentido, puede que aumenten la actividad de Wnt a bajos niveles y la disminuyen a niveles altos (Polakis, 2000; Jones y Jomari, 2002; Shi y col., 2007).


Abu-Jawdeh y colaboradores encontraron una sobreexpresión de SFRP4 (denominado en este trabajo cómo frpHE) en carcinomas endometriales y mamarios infiltrantes (Abu-Jawdeh y col., 1999) usando técnicas de visualización diferencial. A la luz de los resultados anatomopatológicos, nuestro modelo de carcinogénesis mamaria inducida por DMBA muestra una mayoría de carcinomas infiltrantes, lo que está de acuerdo con los resultados de Costa y colaboradores (Costa y col., 2002). Además, el análisis génico por microarray muestra un cambio de expresión aumentado con respecto al momento inicial en el grupo no tratado (DMBA), concordando con los resultados de Abu-Jawdeh. Sin embargo, la expresión se incrementa 3 veces más en el grupo tratado con HT, dato que aumenta hasta el doble tras la validación con RTPCR, no ocurriendo esto para el grupo de DMBA. Este resultado apoya la idea de antagonismo de Wnt a niveles muy altos de expresión y exacerbación de dicha vía a niveles más bajos de sobreexpresión. Así pues, si es cierto que el HT aumenta los niveles de SFRP4 de forma exagerada para bloquear la ruta, la expresión de los genes diana se verá inactivada: c-Myc, ciclina D1, c-

jun, JunB, Fra-1, Fos, FosB, VEGFD (factor D de crecimiento del endotelio vascular), COX-2 (ciclooxigenasa-2), etc., hecho que explicaría la inhibición de expresión validada tras el tratamiento con HT para genes como c-jun, JunB (junb oncogene), así como de Fos (FBJ osteosarcoma oncogene).

Por otro lado, AKT se encarga de inactivar a GSK-3 β . Esto estabiliza a β -catenina (Lacher y col., 2003), a Bad (donde Bad activo bloquea a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl) a caspasa 9, y activa a NF κ B y a CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) que inicia la transcripción de genes prosupervivencia (Maddika y col., 2007), favoreciéndose la supervivencia y proliferación celular. Por otra parte, es probable que SFRP4 inactive AKT, estimulando la apoptosis (Lacher y col., 2003), al igual que PP2A, que además bloquea a la proteína β -catenina (Polakis, 2000; Karim y col., 2004). Siguiendo estas premisas, recordando que el HT activa a PP2A y que en el presente trabajo se ha encontrado que además dicho antioxidante disminuye la expresión de AKT, es lógico pensar que en definitiva, el HT podría atenuar la proliferación de las células tumorales de mama. Esta acción podría estar relacionada de forma muy probable con el bloqueo de la vía canónica y no canónica de la ruta Wnt como consecuencia de la elevada expresión del supresor SFRP4. De este modo, se favorece la apoptosis por la inactivación que esta proteína ejerce sobre AKT, probablemente reforzada por la acción de PP2A y la menor expresión de IER3, así como por el aumento del receptor FAS.




El hidroxitirosol favorece la apoptosis a través de la sobreexpresión de FAS/CD95 y eliminación de ERO.

El receptor FAS (*Figura 1.* ) muestra un aumento de su expresión en el grupo HT (FC: 1.64; P=0.0111. Estudio de RTPCR). La apoptosis o muerte celular programada puede producirse a través de una vía extrínseca (dependiente de los receptores de muerte como FAS) o de una intrínseca o mitocondrial. Tras la unión del ligando al receptor FAS se libera caspasa 8 activa, y si la cantidad de ésta es suficiente (células tipo I) activa a las caspasas efectoras 3, 6, 7 que conducen a la apoptosis. Sin embargo, si no hay bastante caspasa 8 se une a Bid, éste se trasloca a la mitocondria liberando factores proapoptóticos como citocromo c y DIABLO, se activa la caspasa 9 que actúa de retroalimentador positivo sobre la caspasa 8, aumentando los niveles y activándose las caspasas efectoras.


El hidroxitirosol parece originar un aumento en cuanto a los niveles de expresión del receptor FAS tras el tratamiento. Esto tendría especial relevancia en la quimiorresistencia a la adriamicina por parte de las células de cáncer de mama, ya que dicha resistencia está asociada a una carencia de FAS. Razón por la cual es interesante la restauración de esta vía de muerte en las células tumorales usando algún tipo de modificador de la respuesta biológica (ej. IFN γ) para continuar con la quimioterapia (Botti y col., 2004). De igual forma, se podría aumentar la expresión de FAS con HT para luego administrar la adriamicina, sin embargo, este efecto deberá ser convenientemente estudiado en futuras investigaciones. Junto con este mecanismo, el HT disminuye la expresión de c-jun, íntimamente relacionado con la quimiorresistencia. Esto ocurre puesto que se favorece el funcionamiento dependiente de glutatión reducido de la bomba de expulsión de fármacos (ej. Adriamicina) MRP (Multidrug Resistance Protein) (Dorai y col., 2004; Mansilla y col., 2007), así pues, la menor presencia del oncogén resultaría en una reducción de la actividad de MRP.

Por otra parte, al tratarse de un antioxidante, el hidroxitirosol es capaz de facilitar y potenciar la apoptosis inducida por este receptor de muerte. Esto es así porque FAS se inactiva en presencia de ERO, incrementándose la muerte mediada por éste al eliminar estos radicales libres intracelulares (cómo lo hace el HT). De este modo se corrobora la tradicional hipótesis que indica que la ruta de FAS no es inhibida por los antioxidantes

(Aronis y *col.*, 2003). Además explica porqué ciertos antioxidantes promueven la apoptosis de células tumorales, sirvan como ejemplo el coenzima Q y sus análogos (Alleva y *col.*, 2001) o el propio hidroxitirosol (Della Ragione y *col.*, 2002; Guichard y *col.*, 2006).

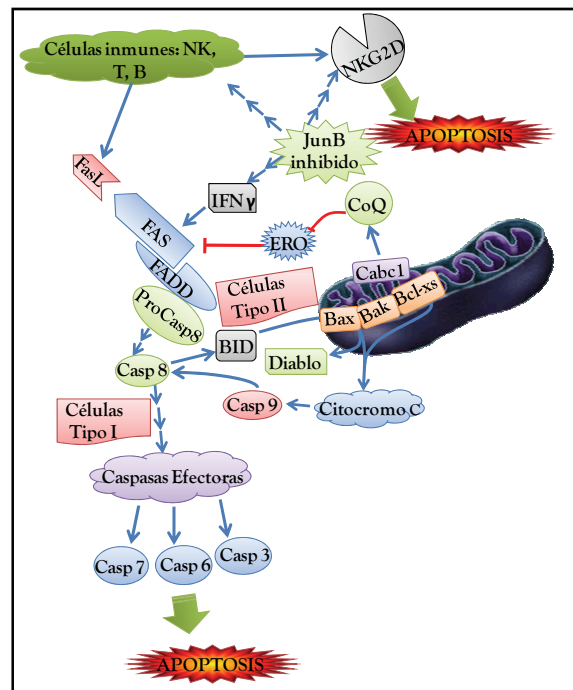
De hecho, el HT aumenta la expresión tras el tratamiento de CABc1 (ABC1 activity of bc1 complex homolog) (FC: 1.71; $P=0.0262$. Estudio de RTPCR) (**Figura 1.** ) a diferencia de los grupos ADR y DMBA. El gen CABc1 codifica una proteína de la membrana interna mitocondrial relacionada con la síntesis de coenzima Q (Mollet y *col.*, 2008). Su expresión se ve inducida en diversas líneas celulares expuestas a fármacos como adriamicina, metotrexato, etoposido y camptotecina, aumentando los niveles de coenzima Q₁₀ como un posible método protector frente a las ERO producidas por la quimioterapia (Brea-Calvo y *col.*, 2006). Es probable que el HT promueva la transcripción de CABc1 con el fin de aumentar la síntesis de coenzima Q₁₀ y ejerciendo un efecto protector sobre la mitocondria. Además presenta un efecto antioxidante frente a daños oxidativos facilitando y aumentando la apoptosis mediada por FAS.

Sin embargo, habría que contemplar la posibilidad de que el HT no sea el responsable del incremento en la expresión de FAS, es decir, que simplemente facilite y potencie la apoptosis iniciada por el sistema inmune ante una célula tumoral. Si atendemos a los resultados obtenidos, tras el tratamiento disminuyó la expresión de JunB. Muy probablemente esto sea debido a que su factor de transcripción NFκβ esté inactivo, además del bloqueo de la vía Wnt. NFκβ activa la transcripción de JunB en situaciones de hipoxia (Schmidt y *col.*, 2007), que por otra parte es una característica de los tumores mamarios inducidos con DMBA (Mathivadhani y *col.*, 2007). Por lo que si el HT disminuye de algún modo la hipoxia intratumoral esta activación será menor y por tanto la transcripción de JunB.

A esta hipótesis hay que sumar la más que probable inactivación de NFκβ por arilación/alquilación de su residuo de cisteína mediada por la forma catecol quinona del hidroxitirosol, y su alta capacidad para eliminar ERO que previene la activación de este factor de transcripción. Este déficit de la proteína JunB (**Figura 1.** ) alerta a las células inmunes de la presencia de células tumorales y estresadas. Éstas son

eficientemente eliminadas por las células NK (natural killer) vía receptor NKG2D. Además, este déficit de JunB induce la producción de $IFN\gamma$ (Nausch y col., 2006) que estimula la expresión de FAS (Botti y col., 2004) y la subsiguiente activación de dicho receptor por células inmunes como NK, linfocitos T y B. Esto explicaría al menos en parte la razón del incremento en la expresión del receptor.

Con la reducción que el HT provoca sobre AKT también disminuiría la activación que este produce sobre la expresión de HIF-1 y la sobreproducción de radicales libres derivada de la hipoxia y del propio HIF-1. Por otro lado, se favorecería la muerte celular inducida por FAS, apoyando la teoría que indicaría al HT como reductor de situaciones de hipoxia intratumoral y preventivo de la expresión de HIF-1, como ocurre con los flavonoides (Mathivadhani y col., 2007).



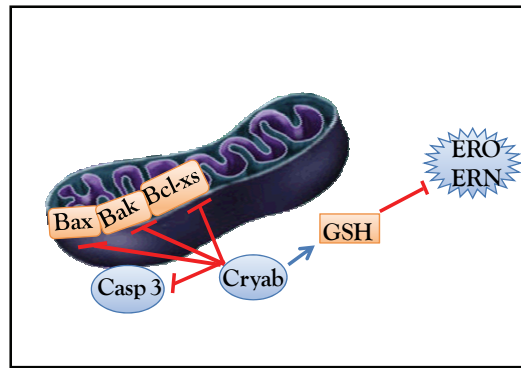
La sobreexpresión de CRYAB en respuesta a la acción antitumoral del HT por parte de la célula tumoral.

En un probable intento de la célula tumoral para escapar de la situación proapoptótica impuesta por el HT, tras el tratamiento con dicho antioxidante se ha observado un crecimiento de la expresión de una pequeña chaperona de choque térmico, CRYAB (α BCrystallin) (FC: 2.4; $P=0.0161$. Estudio de RTPCR) (Figura 1. Cryab). Se trata

de una proteína que se expresa en respuesta a un estímulo dañino como el estrés oxidativo (eliminando los radicales libres dependiendo de glutatión reducido), daño al ADN o la activación de los receptores de muerte TNFR y TRAIL. La proteína codificada por CRYAB impide la translocación a la mitocondria de los factores proapoptóticos Bax, Bak y Bcl-x_s, restringiéndose la liberación de citocromo c e impidiendo la activación de la caspasa 3 (Mehlen y col., 1996a; Mehlen y col., 1996b; Mao y col., 2004; Kamradt y col., 2005; Arrigo y col., 2007).

La expresión constitutiva de este gen es común en varios tipos de tumores: gliomas, cáncer de próstata, células de carcinoma oral escamoso, carcinomas renales, cáncer de cuello y cabeza, cáncer de mama y ductal *in situ* comparado con tejido mamario normal (Gruvberger-Saal y Parsons, 2006; Arrigo y col., 2007). Este aspecto no puede ser constatado en nuestro estudio ya que la expresión basal con respecto a un tejido sano no ha sido realizada. Lo único que se puede afirmar es que el microarray no detecta variación alguna en la expresión al final del estudio para el grupo DMBA que podría estar sobreexpresado o inhibido. Papaconstantinou y colaboradores describen que CRYAB está inhibido en tumores mamarios inducidos con DMBA en ratas Sprague-Dawley 6 semanas después de administrar el carcinógeno (Papaconstantinou y col., 2006). Si tenemos en cuenta esto último sería posible el aumento de expresión (desde un hipotético estado inhibido) con el fin de contrarrestar los efectos proapoptóticos del HT.

En base a estas razones hay que recordar que los antioxidantes no parecen actuar bloqueando la apoptosis inducida por FAS. Este hecho estaría de acuerdo con la inhibición de la muerte por TNFR y TRAIL pero no de FAS por CRYAB, y demostrando que el HT permite la apoptosis mediada por dicho receptor. De todos modos, que esta chaperona no permita la activación de la caspasa 3 no quiere decir que no estén activas otras caspasas efectoras como 6 y 7. Además, tampoco elimina la posibilidad de la liberación de citocromo c, ya que se facilitaría su salida de la mitocondria al tener disminuida la expresión de IER3 antiapoptótico y probablemente de su proteína.



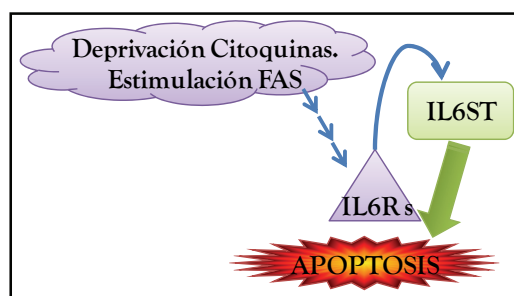
El HT podría incrementar aún más la apoptosis a través del mecanismo de trans señalización mediado por la sobreexpresión de IL6ST.

Anteriormente se ha comentado la validación de un gen en la señalización de interleukina 6 (IL6ST), cuya expresión se ve aumentada tras el tratamiento con HT, siendo muy similar a la de ADR a nivel de microarray.

La incrementada expresión de IL6ST (*Figura 1.* IL6ST) en muestras tumorales confirma la hipótesis de que IL6ST es fundamental para la internalización eficiente del complejo IL6-IL6R (unión de interleukina 6 a su receptor) (Dittrich y col., 1994). Aunque esta ruta clásica se limita principalmente a hepatocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos, y algunos leucocitos, los cuales expresan IL6R en su superficie. Sin embargo, en ciertas ocasiones hay una ruta alternativa iniciada en células que no producen el receptor IL6R de membrana. Viene mediado por un receptor de IL6 secretado/soluble (IL6Rs) (*Figura 1.* ▲ IL6Rs) que se une a IL6. Este complejo es capaz de unirse a IL6ST e iniciar la señalización intracelular (tanto en células que no expresan IL6R, cómo en las que sí), es un mecanismo denominado de trans señalización.

En enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, así como en el cáncer, se han detectado niveles elevados de IL6Rs y de IL6 (Holub y col., 2002; Rose-Jhon y col., 2007). Este mecanismo de trans señalización puede causar apoptosis, ya que se ha estudiado que la estimulación de la apoptosis extrínseca e intrínseca por un daño en el ADN, privación de citoquinas, y estimulación de FAS promueven la liberación de IL6R soluble, apoptosis que es caspasa dependiente (Chalaris y col., 2007). No obstante, que esto ocurra en el presente estudio deberá ser convenientemente estudiado en futuros

trabajos. Así pues, serán necesarios experimentos adicionales que confirmen los procesos de apoptosis, cómo la presencia de caspasas 3, 6, 7, 8 y 9 activas, así como la liberación de citocromo c.



Detención del ciclo celular por la sobreexpresión del supresor tumoral CDKN2A inducida por el HT.

Además de los posibles mecanismos ya descritos, se ha podido constatar en este trabajo que el hidroxitirosol también modifica el patrón de expresión de un gen relacionado con el ciclo celular, CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (*Figura 1. p16*). Dicho gen ha presentado una mayor expresión en el grupo HT (FC: 2.54; $P=0.0183$. Estudio de RTPCR) que en los grupos de ADR y DMBA. Sólo se ha podido validar por RTPCR para el caso del HT, donde se presentó un aumento en la expresión de este gen tras el tratamiento.

El gen CDKN2A codifica para dos proteínas distintas: p16 (INK4A) y p14 (ARF), que están superpuestas y cada una está regulada por su propio promotor. El efecto de p14 consiste en inhibir la proliferación al estabilizar p53 y prevenir su degradación. Así, se promueve de este modo la expresión de p21 que bloquea a ciclinaE/CDK2 y se produce la detención de las células en la fase G1 (Maddika y col., 2007). La expresión de p16 parece reducir la estabilidad de p53 en células epiteliales de mama, mientras que niveles bajos de aquél incrementan las funciones de éste mostrando la relación inversa entre p16 y p14 (Zhang y col., 2006). Sería necesario investigar que proteínas se expresan (p16, p14, p21), así como p53, que ocasiona una detención en la fase G1 en aquellas células con el ADN dañado. Si esto es así podríamos decir que el hidroxitirosol es capaz de dañar el material genético de la célula tumoral, aunque por un mecanismo desconocido.

Cómo se ha visto, el hidroxitirosol protege del daño genotóxico que los radicales libres producen en el ADN de múltiples células humanas. Lo más razonable es pensar por tanto que no activa p53 y que los efectos apoptóticos y antiproliferativos son independientes de este supresor tumoral. Si esto es así, la proteína que debería estar expresándose sería p16 y no p14, siendo por tanto p16 sobre la que se centrará nuestra atención.

Cuando se produce una señal mitogénica, se activa la transcripción de ciclina D y se une a CDK. El complejo inactiva a Rb (Retinoblastoma) y éste no puede antagonizar al factor de transcripción E2F. Esta señal finaliza con la expresión de aquellos genes implicados en la progresión del ciclo celular. No obstante, como medida de represión de la progresión del ciclo, se expresa p16 que bloquea a CDK4/6-ciclina D, con lo que Rb no se inactiva y éste puede antagonizar a E2F, deteniendo la progresión del ciclo en la fase G1 e impidiendo la entrada en S (Caldon y *col.*, 2006; Maddika y *col.*, 2007).


Es probable que el papel de p16 esté relacionado con la parada permanente e irreversible del crecimiento celular (senescencia) en el que la célula no puede volver a entrar en el ciclo, pero es metabólicamente activa (Blomen y Boonstra, 2007). Este estado puede ser inducido por varios tipos de estrés, como por ejemplo el daño al ADN o una señalización mitogénica aberrante en células primarias humanas. Aunque también puede haber una alta relación con el efecto del microambiente celular. Muchos tumores evaden la senescencia, que puede ser una barrera para las células tumorales y que juega un papel importante en la supresión tumoral (Ohtani y *col.*, 2004; Zhang y *col.*, 2006). La expresión de p16 también está relacionada con la quiescencia, fenómeno por el cual las células permanecen en un estado de no proliferación (G0). Sin embargo, existe la posibilidad de entrar en el ciclo celular, y en función de los estímulos, continuar el ciclo, diferenciarse o bien dirigirse a la senescencia. Entre los factores que promueven la quiescencia encontramos p21, p27 y p16 (Blomen y Boonstra, 2007).

Para que esta vía de detención del ciclo celular se lleve a cabo es necesaria la expresión de Rb, aspecto que es típico del modelo de cáncer de mama inducido con DMBA, al igual que la sobreexpresión de ciclina D1, Mdm-2 (desestabilizador de p53),

AKT, etc. (Murray y col., 2005; Papaconstantinou y col., 2006). Con lo cual, es de esperar que nuestro modelo también presente esas características, aunque no lo hayamos encontrado.




Estos resultados sobre el ciclo celular están de acuerdo con los obtenidos por Fabiani y colaboradores. Estos autores describieron un efecto regulador del hidroxitirosol en células de leucemia HL60, indicando que bloquea el ciclo en la fase G1 (Fabiani y col., 2002). Recientemente los mismos autores han observado que el hidroxitirosol causa un incremento de p21 y p27, así como una inhibición de CDK6 en el mismo tipo de células, mostrando también que causa apoptosis en células que están en la fase S, mientras que genera una parada en las fases G2/M y G0/G1 (Fabiani y col., 2008a). Respecto a esto, nuestro estudio sólo puede mostrar que tanto p27 como p21 no se inactivarían por AKT ni AP-1. La razón que lleva a pensar eso es que el primero presenta una expresión inhibida con respecto al pretratamiento, y el segundo correrá una suerte similar puesto que su miembro fundamental, c-jun, ve disminuida su expresión, así como JunB. Por otra parte, Guichard y colaboradores indicaron que el HT produce en células HT29 una detención del ciclo celular en las fases S y G2/M, pero la concentración estudiada era mucho mayor (Guichard y col., 2006).

Estos estudios corroboran nuestra hipótesis acerca de la capacidad del HT de producir una parada del ciclo celular en la fase G1. Además, sería posible este mismo efecto en la fase G2/M por varias razones. Cómo se verá más adelante, este antioxidante disminuye la expresión de c-jun y JunB tras el tratamiento, lo que produce la detención en la fase G2/M (Gurzov y col., 2008), además de una probable disminución de los mecanismos reparadores del ADN. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha constatado mediante un estudio de RTPCR reciente que el HT genera una ligera disminución de la expresión de PARP1 (Expresión de 0.72; $P=0.0074$). Se trata de una polimerasa que arregla roturas dobles y simples de la hebra cuya inhibición protege del daño oxidativo y disminuye la expresión de genes relacionados con los tumores (Aguilar-Quesada y col., 2007). Todo ello junto con una inhibición supletoria de BRCA1 y 2 (Expresión de 0.6; $P=0.005$ y 0.7; $P=0.2$ respectivamente, aunque en este último caso no alcanza significación estadística) no es posible reparar el daño en el ADN que genera la

pérdida de PARP1. Esta situación contribuye a la rotura persistente de la cromatina y la consiguiente detención del ciclo celular en la fase G2/M, así como la inviabilidad celular completa (Farmer y col., 2005) finalizando con la apoptosis (*Figura 1.* ).

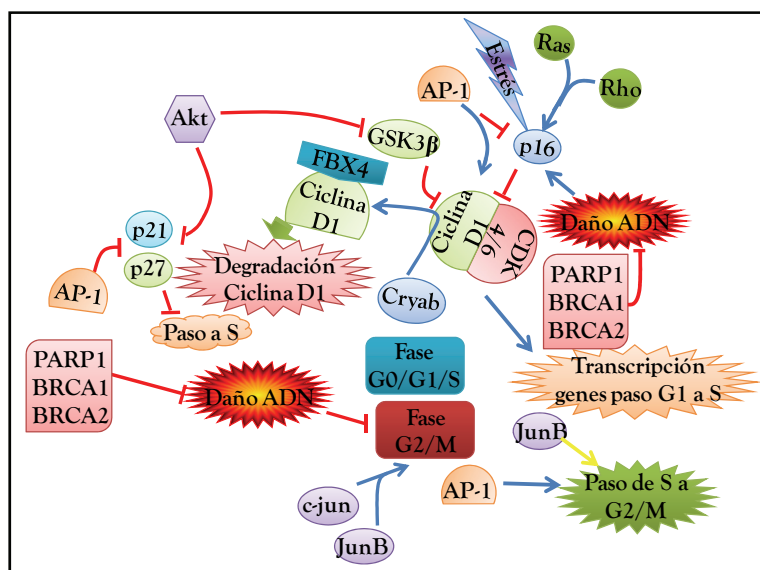
Esta hipótesis cobra fuerza si además tenemos en cuenta que p14 (ARF) está correlacionado con BRCA1. He y colaboradores demuestran que la adición de p14 reduce la expresión endógena de BRCA1 en células de carcinoma mamario MCF-7, que podría formar parte de un mecanismo de retroalimentación. Además, el daño en el ADN ocasionado por la falta de BRCA1 estimula la expresión de p14 y por tanto la detención del ciclo celular (He y col., 2008).

Este mecanismo podría ser causante de una posible expresión de p53 demostrando por primera vez la generación de apoptosis dependiente de p53 por parte del HT, teoría aún por confirmar en estudios posteriores. Recordemos que el HT se transforma en su derivado catecol quinona al reaccionar con ERO como H₂O₂. Estos compuestos electrofílicos además de producir aductos de Michael en proteínas y glutatión, también origina aductos arilantes/alquilantes en el residuo de cisteína de NFκβ (Cornwell y Ma, 2008). Si esto es así, sería conveniente estudiar si el HT genera algún tipo de aducto arilante/alquilante en el ADN. O quizás la inactivación de factores de transcripción relacionados con la expresión de enzimas reparadoras del material genético en células tumorales, lo que explicaría la activación de p53 en el caso de que se produzca realmente. Además, la menor presencia de JunB y AP-1 dificultaría el paso de aquellas células que estén en la fase S hasta la G2/M (Degner y col., 2006; Gurzov y col., 2008).

Por otro lado, esta parada del ciclo celular en la fase G1/S originaría un incremento en la degradación de ciclina D1 (*Figura 1.* ). Esta situación podría estar mediada por GSK-3β (menos impedida al estar disminuida la expresión de AKT por el HT) o incluso por la acción conjunta de CRYAB y FBX4 (F-box 4) (*Figura 1.*  ). En este sentido, debe recordarse que dicha chaperona presenta un aumento de expresión tras el tratamiento con HT. Esto podría ser un efecto probablemente relacionado con una disminución de la apoptosis (cómo ya se ha visto anteriormente) a favor de la detención del ciclo celular en las fases G1, quizá cómo medida protectora de la célula. Esta

detención pasaría por el reconocimiento de la ciclina D1 y su posterior degradación a través de FBX4 siendo un importante modo de mantener la homeostasis en la célula epitelial de mama, y si se altera, se promueve la carcinogénesis (Lin y col., 2006; Barbash y col., 2007; Lin y col., 2008). Sin embargo es un mecanismo que debería ser convenientemente corroborado con los análisis pertinentes.


Así pues, el HT parece promover la senescencia celular parando a las células en la fase G1 al aumentar la expresión de p16 y la posterior degradación de la ciclina D1 por CRYAB/FBX4, en detrimento de la apoptosis. Además, se origina una detención en la fase G2/M como consecuencia de la inhibición tras el tratamiento de c-jun, JunB, PARP1, BRCA1 y 2, así como la probable presencia de otra población celular en quiescencia en relación con la mayor expresión de p16.





El HT induce autofagia de las células tumorales al aumentar la β -oxidación.

Deberardinis y colaboradores encontraron que linfocitos en estado quiescente y en situación de privación de citoquinas presentaban un aumento de la β -oxidación mediada por una mayor expresión de CPT1A (carnitine palmitoyltransferase 1A) (FC: 1.4; $P=0.0375$. Estudio de RTPCR). Esta situación promovería la utilización metabólica de los lípidos tanto exógenos como endógenos dando lugar a la autofagia. Esta vía está

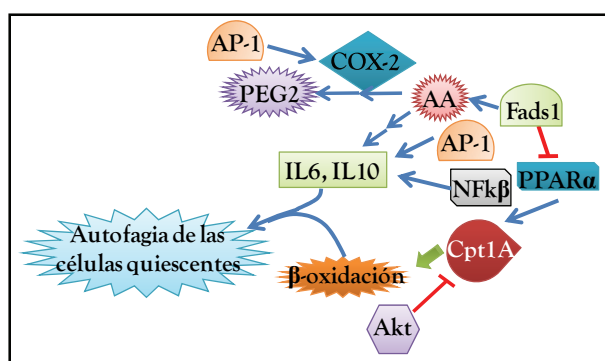
inhibida por AKT en células en proliferación como las tumorales, con el fin de no gastar los materiales necesarios para la proliferación celular (Deberardinis y col., 2006).

El HT podría generar un ligero aumento de la β -oxidación al incrementar CPT1A (*Figura 1.* ) en las células tumorales tras el tratamiento, al igual que en el grupo ADR pero no en DMBA. Si además de este aumento del catabolismo lipídico hay una reducción de citoquinas, las células que estén en quiescencia terminarán en autofagia. El más que probable descenso en la cantidad de AP-1 tras el tratamiento con HT por la inhibición principalmente de c-jun, así como el bloqueo de NF κ B por el HT llevado a cabo posiblemente por sus catecol quinonas, produce una disminución de la expresión de citoquinas inflamatorias como IL1, IL3, IL6, IL10 y TNF α (Park y col., 1993; Sarada y col., 2008), propiciándose el aumento de CPT1A y la oxidación lipídica.

CPT1A se ve expresada transcripcionalmente por PPAR α (*Figura 1.* ) con lo cual, si éste factor estuviese funcionando en nuestro modelo explicaría, al menos en parte, la expresión aumentada de CPT1A. Curiosamente, encontramos una leve disminución de la expresión al final del tratamiento con HT de FADS1 (Fatty acid desaturase 1) (FC: 0.87; $P=0.0184$. Estudio de RTPCR) (*Figura 1.* ) enzima implicada en los primeros pasos del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados (Schaeffer y col., 2006). Esta ligera reducción de FADS1 por el HT hará que aumenten los niveles de PPAR α (Napal y col., 2005; Rodríguez-Cruz y col., 2006), repercutiendo en una mayor expresión de CPT1A y por tanto del catabolismo lipídico.

Esta ligera disminución en la expresión de FADS1 aparentemente promovida por el HT, hará que se acumulen eicosanoides hipotéticamente antiinflamatorios (ácido dihomo- γ -linolénico) y bajen los niveles de los inflamatorios (ácido araquidónico). Además disminuyen los sustratos de COX-2 y por tanto la síntesis de PGE₂ (Prostaglandina E₂), lo que termina reduciendo la síntesis de estrógeno por parte de la aromatasa. De este modo se reduce la capacidad de la promoción tumoral, angiogénesis, metástasis y aumentando la apoptosis, finalizando con la disminución de la síntesis de citoquinas inflamatorias (Utsunomiya y col., 2000; Schaeffer y col., 2006; Howe, 2007). Esto está en total concordancia con lo demostrado por Maiuri y colaboradores en células J774

(macrófagos) estimulados con lipopolisacárido bacteriano. Estos autores encontraron que el hidroxitirosol reducía la producción de PGE_2 , y por lo visto no era una consecuencia directa de la inhibición que el HT produce sobre la COX-2 (Maiuri y col., 2005). Estas apreciaciones indican que quizá el hidroxitirosol genere una disminución de IL6. Si esto es así, aunque se haya observado que IL6ST está aumentado con respecto al pretratamiento, no quiere decir que necesariamente esté llevando a cabo la vía tradicional de señalización de IL6. Se puede pensar esto porque cabría esperar una baja cantidad, con lo cual adquiere peso la posibilidad del fenómeno de trans señalización que favorecería la apoptosis.



Inhibición de la expresión de oncogenes c-jun y JunB.

El HT ha mostrado en este estudio ser capaz de inhibir la transcripción de genes relacionados con procesos tumorales a diferencia de ADR y DMBA, cómo es el caso de los factores de transcripción c-jun (FC: 0.48; $P=0.0337$. Estudio de RTPCR) y JunB (FC: 0.56; $P=0.0334$. Estudio de RTPCR) (*Figura 1.* **c-jun** y **JunB**). La inhibición de la expresión de estos factores de transcripción podría venir dada perfectamente por el bloqueo de la ruta Wnt por parte de SFRP4. Incluso por una inactivación mediada por la capacidad antioxidante del HT o inactivación arilante/alquilante de $NF\kappa\beta$, que induce la transcripción de estos factores (Bachmeier y col., 2007; Schmidt y col., 2007) por parte del HT en su forma catecol quinona. De este modo, se alteran las señales de proliferación, diferenciación celular, etc.

Al estar inhibida la expresión de c-jun, se deben producir una serie de acontecimientos beneficiosos para la eliminación tumoral. Por una parte se acumula p53, p21 y Rb facilitando la apoptosis y la detención del ciclo celular, y por otra, no se estimula ni la invasividad, motilidad, ni metástasis celular, ni la expresión de VEGF, y por

tanto, la angiogénesis (Vleugel y col., 2006; Zhang Y y col., 2007a; Zhang Y y col., 2007b). Sin embargo, estos resultados se oponen a los de Della Ragione y colaboradores, quienes encontraron que el hidroxitirosol causaba apoptosis relacionada con la mayor expresión de c-jun, que tras ser activado por JNK podría seguir una ruta proapoptótica en células de leucemia HL-60 (Della Ragione y col., 2002). Además, Guichard y colaboradores encontraron un efecto similar, ya que la apoptosis que el hidroxitirosol producía en células de carcinoma de colon HT-29 era dependiente de la activación que causaba sobre JNK y AP-1 (jun/fos), entre otras (Guichard y col., 2006). Este efecto contradictorio puede ser perfectamente debido al tipo de célula, y más probablemente a que se trata de ensayos *in vitro* en los que las células no están sujetas a factores externos como el microambiente tumoral, regulación fisiológica, etc.

Cómo se ha visto en el estudio de la ruta de señalización Wnt, entre los genes diana están c-jun, JunB y Fos, que pueden formar el complejo de transcripción AP-1 (Licht y col., 2006; Zhang Y y col., 2007a) donde c-jun es el miembro imprescindible para su formación (Vleugel y col., 2006). Por tanto, los efectos mediados por este complejo se podrían ver bloqueados. Un ejemplo podría ser el caso de COX-2. En concreto, AP-1 unido a CREB, induce la transcripción de esta enzima implicada en el proceso carcinogénico. Se podría teorizar que el HT inhibe la expresión de COX-2 mediada por el factor de transcripción AP-1 derivado del bloqueo por SFRP4 de la ruta Wnt. Del mismo modo también podría ocurrir esto por la inactivación de NF κ B por la forma catecol quinona del HT, acción inhibitoria sobre la COX-2 *in vivo*, que se correlaciona con la capacidad inhibitoria de la COX-2 que tiene el hidroxitirosol.

Se puede discutir sobre la capacidad que tiene este compuesto fenólico de inhibir la expresión del complejo de transcripción AP-1, tanto a nivel de homodímeros de c-jun/junb, como de heterodímeros c-jun/c-fos. En este caso, se bloquearía la activación transcripcional de proteínas antiapoptóticas como bcl-2, bcl-xL, y de otras relacionadas con la angiogénesis, metástasis (VEGF, MMP, colagenasas, proteasas, TGF β y uPA), ciclo celular (ciclina D1), etc., con el consiguiente efecto promotor sobre p53, p16 y p21 favoreciendo el bloqueo del crecimiento tumoral (Milde-Langosch y col., 2000; Dorai y col., 2004; Gutzman y col., 2004; Degner y col., 2006).

Otras vías aparentemente no afectadas por el tratamiento con HT.

Para finalizar, merece la pena hacer una breve reseña sobre una serie de secuencias génicas que han sido validadas en el grupo tratado con HT pero que no proporcionan información relevante en estos momentos. Así por ejemplo, el resultado tan contradictorio encontrado para el gen *NHN1* (conserved nuclear protein *Nhn1*) al igual que ocurre en el caso del grupo tratado con ADR, se podría explicar porque el microarray muestra que para la sonda hibridada hay dos posibles secuencias posibles. Una de ellas es *NHN1* y la otra es *FLT4*, posiblemente por una cierta homología de la sonda para esas dos secuencias. Sin embargo, tras la comprobación de una posible homología entre esas dos secuencias génicas con la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no surge relación posible.

Tras la utilización de la herramienta NETAFFX™ (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) de Affymetrix, se ha encontrado que la sonda usada en el estudio de microarray (1377460_at) se corresponde con un TRANSCRIBED LOCUS. Por tanto, no es posible saber a qué secuencia se unió la sonda. Además en la validación por RTPCR se incluye el estudio de *NHN1*, aunque tal vez hubiese sido más interesante *FLT4* (*VEGFR3*).

Al margen de esta controversia, aparecen genes relacionados con el Alzheimer (*APBB3*) (FC: 0.49; $P=0.0331$. Estudio de RTPCR) (McLoughlin DM y Miller, 2008) que *a priori* no presentan relación alguna con el cáncer de mama. Además, también se observa que entre los resultados hay una anhidrasa carbónica (*CAR11*) (FC: 0.55; $P=0.0337$. Estudio de RTPCR), siendo un miembro sin actividad catalítica (Supuran, 2007). Mientras que tanto la ciclina L2 (*CCNL2*) (FC: 0.5; $P=0.0046$. Estudio de RTPCR) como *PER2* (FC: 0.53; $P=0.0013$. Estudio de RTPCR) no son relevantes en el estudio ya que el HT no tiene efecto alguno sobre su expresión, cuya inhibición compartida con el grupo DMBA parece ser propia del modelo.

V.2.- RESUMEN DE LA HIPÓTESIS SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL HIDROXITIRO SOL.

A la vista de lo discutido en los epígrafes correspondientes, el hidroxitiro sol ejercería su acción antitumoral en 5 frentes fundamentales:

- 1) Bloqueo de la vía de señalización de supervivencia y proliferación celular Wnt.
- 2) Apoptosis.
- 3) Detención del ciclo celular.
- 4) Descenso de los reservorios de lípidos destinados a la proliferación celular como consecuencia del incremento de la expresión de genes implicados en la β -oxidación.
- 5) Bloqueo y disminución de los niveles de factores de transcripción implicados en procesos oncogénicos (*Figura 1*).

Bloqueo de la vía de señalización de supervivencia y proliferación celular Wnt.

El tratamiento con HT promovería una marcada liberación de SFRP4 que bloquearía de forma directa a los receptores Frizzled y a sus ligandos Wnt. Este bloqueo impediría la activación de la ruta Wnt, tanto en su vía no canónica mediada por el flujo de Ca^{2+} , proteínas G y JNK que activa a c-jun, cómo la canónica dependiente de β -catenina. Al bloquearse la iniciación de la ruta ésta no se activa, por lo que la β -catenina unida Axina y GSK-3 β se destinaría a su degradación. De este modo se evitaría la activación que conduciría a la translocación de la β -catenina al núcleo para comenzar la transcripción de genes diana cómo Myc, JunB, c-jun, ciclina D1, Fos, VEGFD, COX-2, etc., implicados en procesos de la carcinogénesis cómo ciclo celular (fases G1/S, G2/M), metástasis, angiogénesis, apoptosis, e incluso resistencia a la quimioterapia.

Efectos a nivel de apoptosis.

Por otro lado, el HT incrementa la expresión génica del receptor muerte FAS por un mecanismo aún desconocido. No obstante, tal vez lo anterior podría ser consecuencia de la baja presencia de JunB, situación que induce a la producción de IFN γ y que promueve la expresión de FAS, así como del receptor NKG2D. Esta situación es detectada por las células inmunes que liberan ligando de FAS (FasL). Lo anterior iniciaría la cascada apoptótica vía FAS en conjunción con la acción de las células NK sobre el receptor

NKG2D, potenciándose la señal apoptótica. La unión de FasL a su receptor FAS activaría a la caspasa 8, que si está en cantidad suficiente (células tipo I) activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 para finalizar con la apoptosis. Sin embargo, si no hay suficiente caspasa 8 (células tipo II) ésta activa a Bid que se transloca a la mitocondria liberando factores proapoptóticos como DIABLO y citocromo c. Se activa la caspasa 9 que actúa de retroalimentador positivo sobre la 8, y aumentando sus niveles y potenciándose la activación de las caspasas efectoras.

El HT también estimula la síntesis de coenzima Q₁₀ al aumentar la producción de CABC1. De este modo se protege a la mitocondria y se eliminan ERO intracelulares, acción potenciada por la alta capacidad antioxidante del HT. Esta situación favorece e incrementa la apoptosis mediada por FAS, a la que se suma la baja expresión de IER3 antiapoptótico (lo que facilita la liberación de citocromo c), probablemente mediada por dos posibles razones, una por el bloqueo que ejerce p53, el cual no es inactivado por c-jun debido a la menor cantidad de este oncogén, y la otra por la menor cantidad del complejo AP-1 relacionada con el déficit de c-jun, JunB y Fos.

La reducción que el HT provoca sobre la expresión de AKT tiene una importante repercusión sobre la supervivencia y proliferación celular. Esto es porque se reduce el posible bloqueo que ejerce sobre GSK-3 β (que puede seguir estabilizando a β -catenina), sobre la caspasa 9 y sobre Bad (lo que le permite bloquear a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl, ayudado por la menor activación que sobre éstas produce el complejo AP-1 que se encontraba inhibido). De este modo se potencia la señal apoptótica en detrimento de la transcripción mediada por CREB de genes relacionados con la supervivencia. Además, el HT activa a PP2A que bloquea la activación de AKT. Esta situación que se ve reforzada por la ausencia de IER3 antiapoptótico, no bloqueándose la acción de PP2A. A esto hay que añadir la inactivación de NFk β que ejercen por un lado las formas catecol quinonas del HT y la eliminación de ERO intracelulares que ejerce el antioxidante. A lo anterior hay que unir la menor acción por parte de AKT sobre NFk β , con lo que no se hace necesaria la activación de IER3 proapoptótico como parte del mecanismo autodestructivo de NFk β . De este modo, se reduce la acción antiapoptótica y de progresión del ciclo, y por tanto la supervivencia y proliferación celular.

En un intento de la célula tumoral de evadir la apoptosis, se expresa la chaperona CRYAB con el fin de impedir la translocación a la mitocondria de las proteínas proapoptóticas Bax, Bak y Bcl-xs. Así, se reduciría también la liberación de citocromo c e impidiendo la activación de la caspasa 3, aumentando también la eliminación dependiente de glutatión de ERO y ERN.

Efectos conducentes a la parada del ciclo celular.

El HT afecta genes relacionados con el ciclo celular, de tal modo que induce la expresión del supresor tumoral CDKN2A. Si dicha inducción es realizada por p53 se activaría la transcripción de p14 (ARF) que estabiliza a p53, resultando en la apoptosis celular. Sin embargo, si la expresión se induce por una señal oncogénica como Rho o Ras, estrés o un daño en el ADN, se transcribe p16 (INK4A) que bloquea al complejo ciclina D1-CDK4/6. Este bloqueo impide la transcripción de los genes implicados en la progresión de la fase G1 a la S, y la célula queda detenida en la G1. El proceso se ve favorecido por la baja presencia de bloqueantes como AP-1 (por los bajos niveles de c-jun, JunB y Fos) que no impide la transcripción de p16 ni activa la de ciclina D1, por la baja expresión de AKT. Esta situación favorece la degradación de ciclina D1 mediada por GSK-3 β y posiblemente potenciada por FBX4, promovida por el reconocimiento previo de esta ciclina por parte de CRYAB. Además, el paso a la fase S también se verá dificultada por p21 y p27 que no estarán inactivados por AKT ni por AP-1.

Aquellas células que estén ya en la fase S verán dificultada su progresión a la G2/M por la baja cantidad de JunB y AP-1. Es posible que ocurra una detención del ciclo en la fase G2/M como consecuencia de la menor expresión c-jun y JunB, así como de los factores implicados en la reparación del ADN (PARP1, BRCA1 y 2). Dicha situación impediría la correcta reconstrucción del material genético, pudiendo ser uno de los motivos desencadenantes de la expresión de p16. Esta situación induciría la aparición de células en senescencia y quiescencia.

Efecto sobre la expresión de genes asociados al metabolismo lipídico.

El HT también parece aumentar la β -oxidación al incrementar la transcripción de CPT1A y disminuyendo su inactivación por AKT. CPT1A puede verse expresado por un

incremento en PPAR α como consecuencia de la leve disminución de FADS1 que promueve el HT. Esto implica la menor síntesis de ácido araquidónico, citoquinas inflamatorias, prostaglandina E₂ (descenso potenciado por la menor presencia de COX-2 debido al bloqueo de Wnt y a la menor cantidad de AP-1 que la transcriba), etc., reduciéndose la carcinogénesis, inflamación y la cantidad de lípidos disponibles para la proliferación. Esta situación de privación de citoquinas potenciado por la disminución en la transcripción mediada por AP-1 y NF κ B, junto al incremento en la β -oxidación podría inducir la autofagia de las células tumorales en quiescencia.

Por último, esta situación de privación de citoquinas junto con la estimulación de FAS podría dar lugar a la liberación de receptor de IL6 soluble (IL6Rs), que tras unirse a IL6ST iniciaría o potenciaría la apoptosis previa.

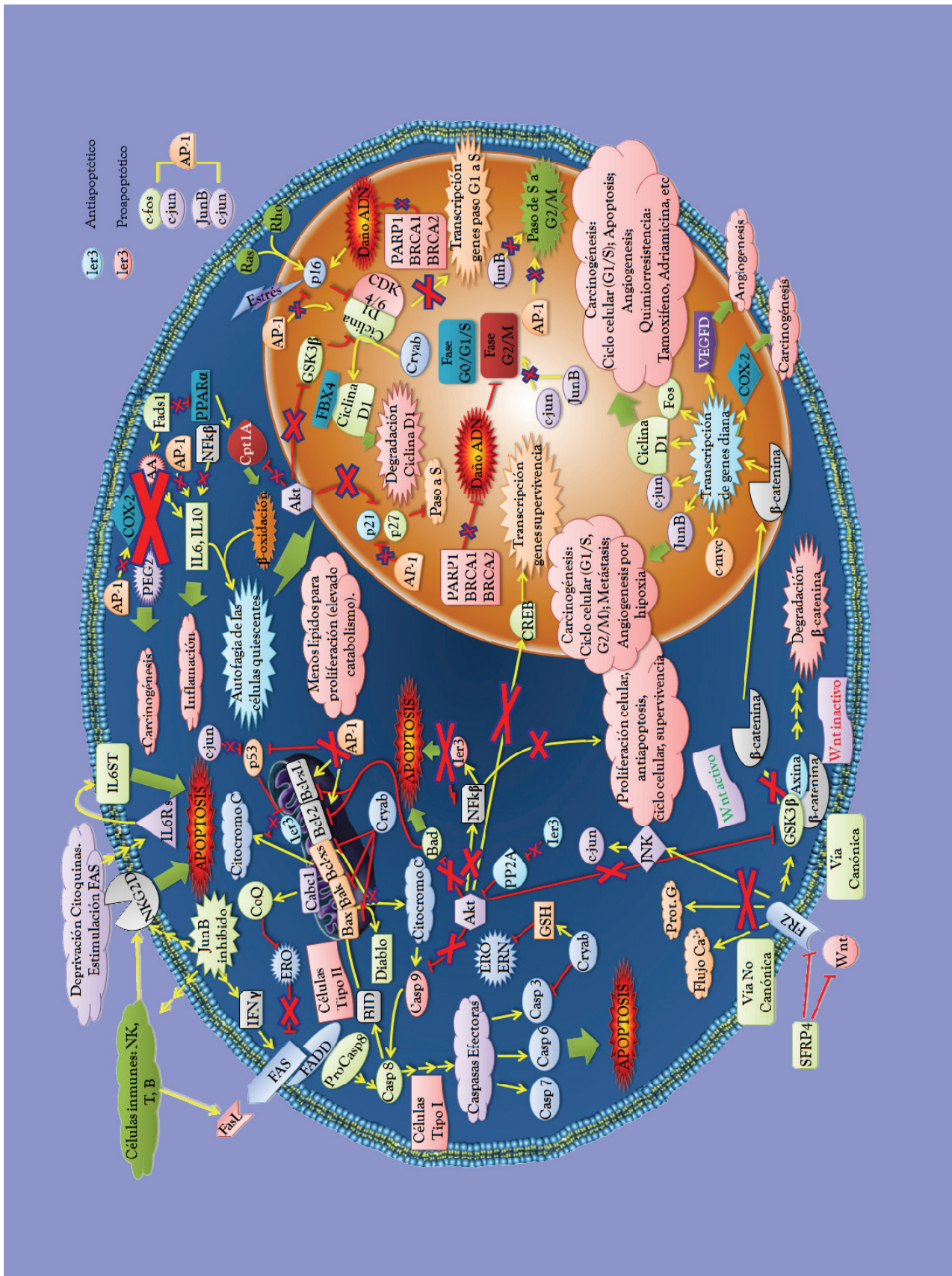
Bloqueo y disminución de los niveles de factores de transcripción implicados en procesos oncogénicos.

En conjunto, tal y como se ha descrito en los epígrafes anteriores, el tratamiento con hidroxitirosol produciría una reducción en la transcripción de factores oncogénicos.

Este es el caso de c-jun y JunB, situación que produciría además una reducción en la formación del complejo de transcripción AP-1. Como se ha revisado anteriormente, la inhibición de tales genes tendría repercusiones sobre la apoptosis, ciclo y proliferación celular. Esto constituiría un importante pilar en la parada del crecimiento tumoral que produce el hidroxitirosol.

Es necesario recordar que esta hipótesis ha de ser confirmada en estudios posteriores a nivel proteico mediante técnicas de inmunohistoquímica, y a través de otros modelos y herramientas (knockout, ARNsi, etc).

Figura 1. Rutas moleculares implicadas en la hipótesis sobre el mecanismo de acción antitumoral del hidroxitirosol.



V.3.- GENES CONFIRMADOS EN EL GRUPO ADRIAMICINA.

La adriamicina reduce la proliferación celular bloqueando la transcripción de NPY.

La adriamicina produce una fuerte inhibición de la expresión del neuropéptido Y (NPY) (FC: 0.1; $P=0.001$. Estudio de RTPCR). Este gen codifica un péptido con efectos relevantes en la progresión tumoral, específicamente sobre la proliferación celular, invasión de la matriz, metastatización, y angiogénesis. Recientemente ha surgido la relevancia de este neuropéptido y de sus receptores en tipos de cáncer endocrino, que dependen, al menos en parte, del efecto trófico de hormonas específicas. Cánceres como el de mama, ovario, próstata, pituitarios, adrenocorticales, neuroblastoma, feocromocitoma y gastroenteropancreáticos, pueden estar relacionados con la producción de NPY, la expresión de sus receptores o ambas posibilidades. Así pues, NPY está relacionado con la progresión del cáncer de mama (Ruscica y col., 2007). Se trata por tanto de un nuevo efecto inhibitorio de la proliferación celular descrito para la adriamicina que abre nuevas posibilidades de investigación sobre esta interacción.

La inhibición de CDC25B por la adriamicina impide la progresión del ciclo celular.

Un mecanismo seguido por la adriamicina que no parece seguir el hidroxitirosol, es el relacionado con Cdc25b. Este gen codifica una proteína fosfatasa implicada en las fases S y G2/M del ciclo celular (Kawabe, 2004). La inhibición de Cdc25B con ARNsi (siRNA: small-interfering RNA) resulta en una acumulación de células en la fase G2 (Boutros y Ducommun, 2008). Su expresión anormal en numerosos tumores humanos genera un aumento en la inestabilidad genómica (Boutros y col., 2007), estimula la progresión del ciclo celular y la transformación maligna de las células. Además es importante en las fases tempranas de la progresión del carcinoma de mama (Ito y col., 2004). En el presente estudio se ha observado una inhibición confirmada por RTPCR (FC: 0.27; $P=0.0038$. Estudio de RTPCR), lo cual está de acuerdo con resultados de estudios previos. Así, por ejemplo se ha descrito que con una dosis de 4mg/kg de doxorubicina produce una pérdida del punto de control en G2/M por la pérdida de Cdc25B. Dicho estudio se realizó en células deficientes en p53, usando un modelo de ratón desnudo. La pérdida del

punto de control está mediada por la activación de p38 en respuesta a un daño en el ADN, resultando en una catástrofe mitótica y una regresión de los tumores murinos *in vivo* (Reinhardt y col., 2007).

La adriamicina origina desórdenes hematológicos con un posible papel en la hipoxia tumoral.

La adriamicina también genera una marcada disminución de la expresión en otros genes como HBB (FC: 0.05; $P=0.0087$. Estudio de RTPCR). Este gen codifica una proteína (cadena beta-globina de la hemoglobina) que está implicada en el transporte de oxígeno hacia los tejidos periféricos, tradicionalmente, su pérdida se ha relacionado con la beta talasemia (Chang *et al.*, 2008).

Es ampliamente conocido que la adriamicina genera anemia (sal-Shabanah y col., 1998), y esta reducción en la cadena beta de la hemoglobina ocasionaría, además de la consabida anemia, un reparto menor de oxígeno. Esta situación generaría una hipoxia tumoral, hecho que favorecería la angiogénesis y posiblemente la metástasis. Por otro lado, la pérdida de HBB a nivel tumoral se ha relacionado con un incremento en la proliferación y crecimiento tumoral en cáncer tiroideo anaplásico, mientras que su recuperación disminuye dicho crecimiento (Onda y col., 2005). No tenemos nada que demuestre que la pérdida de HBB en nuestro modelo genere un aumento del crecimiento tumoral. Sin embargo, si es más probable que ocasione anemia, por este motivo sería razonable diseñar una estrategia para comprobar si esta reducción en la expresión de HBB está relacionada con un posible efecto tóxico como la anemia. Además, estudios futuros deberán realizarse para comprobar si dicha situación implica un aumento de la hipoxia tumoral y la reducción de la habilidad inhibidora del crecimiento tumoral.

Esa situación de anemia/hipoxia tumoral se ve agravada por HBA-A1 cuya expresión disminuyó tras el tratamiento con adriamicina (FC: 0.07; $P=0.0138$. Estudio de RTPCR). Este gen codifica una proteína que forma cadenas en la hemoglobina adulta con lo que estaría implicada en el transporte de oxígeno, y su ausencia origina lo que se conoce como alfa talasemia (Bernini y Hartevelde, 1998). Además, la expresión de la hemoglobina alfa 2

se ha encontrado disminuida en células K562 de leucemia humana resistentes a la doxorubicina (Ichikawa *y col.*, 2004).

Por otro lado, la probable beta talasemia generada por la adriamicina se ve disminuida gracias a la reducción de la expresión de la globina alfa (GLOA; LOC287167) (FC: 0.12; $P=0.0254$. Estudio de RTPCR). Este aspecto ha sido recientemente observado por Voon y colaboradores, tras la inhibición de la globina alfa con ARNsi (Voon *y col.*, 2008). Tal ausencia ocasiona alfa talasemia (Adam *y col.*, 2005), y aunque tradicionalmente se considera heredada, también se han descrito talasemias no heredadas (Steensma *y col.*, 2005; Forget, 2006). Pero además, la sobreexpresión de la globina alfa origina apoptosis en células hematopoyéticas FL512 (Brecht *y col.*, 2005a) mediado por la regulación de GATA2 (Brecht *y col.*, 2005b).

Pero el tratamiento con ADR parece no quedar ahí, ya que se ha observado otro gen muy inhibido que codifica la enzima aminolevulínico ácido sintasa 2 (ALAS2) (FC: 0.05; $P=0.037$. Estudio de RTPCR). El producto de este gen es una enzima eritroide mitocondrialmente localizada. La proteína codificada cataliza el primer paso en la ruta biosintética del grupo hemo. El defecto en este gen causa anemia sideroblástica relacionada con pirodoxina X (Bishop, 1990; Lee *y col.*, 2006).

Así pues, se estaría hablando de otro gen inhibido por el tratamiento con doxorubicina relacionado con la anemia. En este caso no está implicado en la síntesis de la hemoglobina como los anteriores, sino que se relaciona con la biosíntesis del grupo hemo. Este efecto de la quimioterapia causante de anemia sideroblástica, podría haber sido previamente descrito por Dhot y colaboradores, que describieron la producción de anemia refractaria con presencia de sideroblastos en anillo en carcinoma de mama tras el tratamiento quimioterápico (Dhot *y col.*, 1994).

En general, se observa una reducción en la expresión de genes relacionados con desórdenes hematológicos. Estas secuencias están presuntamente relacionadas con la administración de la quimioterapia. Dichos desórdenes hematológicos podrían ser una consecuencia del síndrome mielodisplásico en pacientes con cáncer de mama (Smith,

2003a; Smith y col., 2003b) consecuencia de la mielosupresión que ocasiona la adriamicina (Kaklamani y Gradishar, 2003). Si el defecto de hemoglobina, así como el del propio grupo hemo, generados por la adriamicina ocasionan un déficit de oxígeno en los tejidos periféricos, incluido el tumor, la hipoxia será mayor en estos animales ya que se une a la típica hipoxia del modelo de DMBA (Mathivadhani y col., 2007). De este modo, la probabilidad de angiogénesis y posterior metástasis es mayor.

Sin embargo, los probabilidades de metástasis disminuyen ligeramente, ya que en nuestro estudio la adriamicina reduce la expresión de una kinasa que promociona la metástasis tumoral cuando está sobreexpresada (LIMK2) (FC: 0.83; $P=0.0325$. Estudio de RTPCR) (Scott y Olson, 2007). Sería interesante estudiar la repercusión que tiene la inhibición de los genes relacionados con la síntesis de hemoglobina y de grupo hemo en el tumor, o en el microambiente tumoral. ¿Será señal de hipoxia en el microambiente tumoral? ¿Qué implicaciones tendrá sobre el crecimiento tumoral y eficacia de la quimioterapia? Futuras investigaciones han de realizarse para contestar dichas cuestiones.

La sobreexpresión de ADRA2A cómo posible vía de escape de las células tumorales a la citotoxicidad de la adriamicina.

Otro gen sobreexpresado en el grupo tratado con adriamicina es el que codifica para el receptor alfa adrenérgico 2 (ADRA2A) (FC: 2.89; $P=0.0288$. Estudio de RTPCR). Este resultado para la doxorubicina es muy interesante, ya que se ha descrito a nivel cardiovascular un descenso en la expresión de proteína del receptor adrenérgico alfa 1, a una concentración de 0.3 μM (Murata y col., 2001), pero no a nivel tumoral de Adra2a.

El receptor alfa adrenérgico 2, y en general todos los receptores alfa adrenérgicos, están relacionados con la proliferación celular en líneas celulares tumorales. En líneas de cáncer de mama, se ha visto que se expresa sólo en células hormono independientes. Así, en líneas agresivas HS-578T insensibles a hormonas, la expresión elevada de ARN de ADRA2A mediante RTPCR, así como sus niveles de proteínas totalmente funcionales, se relacionaron con un aumento en la proliferación de dichas células (Vázquez y col., 2006). Sin embargo no se expresa en células sensibles a hormonas cómo MCF-7. Por tanto, no existiría la estimulación de la proliferación mediado por derivados de estrógenos cómo los

catecolestrógenos a partir del 17β -estradiol sobre los receptores alfa adrenérgicos 2b y 2c (Chiesa y *col.*, 2008).

Un posible mecanismo por el cual la activación de ADRA2A promueve la proliferación celular puede ser el mediado por AKT y la transactivación de EGFR. Se ha descrito en células de feocromocitoma (PC12) que ADRA2A activa a fosfolipasa C, se produce la liberación de ácido araquidónico y su oxidación por epoxidasa dependiente de citocromo P450. A continuación se estimulan metaloproteasas de la matriz y se genera una transactivación de EGFR. Este mecanismo tiene lugar a través de la activación de Src y de la liberación de factor de crecimiento tipo EGF de unión de heparina (HB-EGF), resultando en la activación de AKT y MAPK (Karkoulías y *col.*, 2006). Este mecanismo es muy similar a lo que ocurre en células CaCo2, en las que también se genera la activación de PI3K/AKT por la transactivación de EGFR (Buffin-Meyer y *col.*, 2007).

La sobreexpresión de ADRA2A podría ser un intento de la célula tumoral de esquivar la acción citotóxica de la adriamicina. Sería interesante observar que cambios se producen si se administran antagonistas de ADRA2A (ej. Yohimbina) en aquellos tumores tratados con adriamicina sobre la proliferación celular. Además de esta posibilidad, dicho aumento de ADRA2A podría estar relacionado con un incremento en la resistencia a la hipoxia. Este efecto podría ser similar al que ocurre en neuronas sometidas a hipoxia hipobárica (Chang y *col.*, 2006) en contraposición a la hipoxia generada por la baja síntesis de grupo hemo y de las cadenas de la hemoglobina. Situación que resulta en una disminución del transporte de oxígeno al tumor. Esta condición de hipoxia explicaría perfectamente la reducción en nuestro estudio de la expresión de SQLE. La razón es que la menor expresión de este gen es un mecanismo de adaptación de los hepatocitos de ratones a situaciones de hipoxia (Dolt y *col.*, 2007), disminuyéndose la síntesis de esteroides (Xu y *col.*, 2008).

La sobreexpresión de SGCG por la adriamicina podría reducir el crecimiento tumoral.

Otro gen cuya expresión se ve aumentada por el tratamiento con adriamicina es SGCG [sarcoglycan, gamma (dystrophin-associated glycoprotein)] (FC: 3.54; $P=0.0306$. Estudio de RTPCR).

Este gen codifica una glicoproteína perteneciente al sarcolema de músculo estriado, a las cuales se asocia la proteína del citoesqueleto llamada distrofina, proteína producto del gen de la distrofia muscular de Duchenne. Esta proteína del sarcolema forma parte de un complejo de glicoproteínas: alfa, beta, gamma y delta. Los defectos genéticos de estas proteínas causan cuatro formas distintas de distrofias musculares, y por tanto la degeneración del músculo, tanto esquelético como cardíaco (Matsumura y col., 1999; Hack y col., 2000). La deficiencia de tales sarcoglicanos se denomina sarcoglicanopatía, y la relacionada con la deficiencia en la expresión del gen de gamma sarcoglicano se conoce como gamma-sarcoglicanopatía (Watchko y col., 2002). La mutación en el gen gamma sarcoglicano produce una sarcoglicanopatía, una distrofia muscular severa conocida como LGMD-2C (Limb-Girdle Muscular Dystrophy), que incluye la distrofia muscular de Duchenne y de Becker. Las sarcoglicanopatías muestran niveles normales de distrofina, mientras que las distrofinopatías presentan deficiencias de todas los sarcoglicanos (Watchko y col., 2002).

Cómo se ha anotado anteriormente, la deficiencia de esos sarcoglicanos origina tanto distrofia muscular en músculo esquelético como en cardíaco. Así pues, la deficiencia del complejo distrofina-sarcoglicano da lugar a miopatías (Heydemann y col., 2007). Incluso tras un infarto agudo de miocardio, se puede originar un fallo cardíaco como consecuencia de la disminución en el complejo distrofina-sarcoglicano (Yoshida y col., 2003).

En relación con el cáncer, y más concretamente con el de mama, no hemos encontrado relación alguna con el gen gamma sarcoglicano. No obstante, hay un quinto sarcoglicano, el épsilon, que parece estar relacionado con la adhesión y la integridad celular (Piras y col., 2000). Por otro lado, un componente del complejo glicoproteína-

distrofina, el distroglicano, tiene un papel importante en el desarrollo de las células epiteliales, formación del basamento de las membranas y la organización de la arquitectura tisular. Este aspecto ha sido muy estudiado en células epiteliales de mama, y cuya pérdida está relacionada con la progresión del cáncer (Weir y Muschler, 2003; Brennan y col., 2004). En cánceres humanos de mama, colon, cabeza y cuello, y de próstata, se ha observado una reducción o pérdida de la expresión de los genes de los distroglicanos. Dicha pérdida o reducción da como resultado un aumento de la invasión, diseminación tumoral (Brennan y col., 2004), y la progresión tumoral (Sgambato y col., 2003). Por último, la sobreexpresión de utrofina salvaje, una proteína relacionada con la distrofina, en células de cáncer de mama, origina una reducción del crecimiento celular *in vitro* y en ratones desnudos (Li Y y col., 2007).

En base a estas premisas, la sobreexpresión del gen SGCG encontrada en los tumores mamarios tratados con adriamicina, podría estar indicando un papel similar al que tienen los genes relacionados con la distrofina sobre las células epiteliales y por tanto sobre la progresión tumoral. Sin embargo, la hipótesis de que la sobreexpresión de SGCG sea inhibidor del crecimiento tumoral tendrá que ser estudiada, y en caso de ser confirmada se describiría un mecanismo novedoso de la adriamicina como agente antitumoral.

La sobreexpresión de THRSP como posible marcador de la acción inhibidora de TOP2A semejante a FAS (Fatty Acid Synthase).

Otro gen que se encuentra muy sobreexpresado en los carcinomas mamarios tras el tratamiento de la adriamicina es THRSP (thyroid hormone responsive protein) (FC: 5.17; $P=0.0349$. Estudio de RTPCR). THRSP es un gen que codifica una proteína similar al producto del gen S14, un gen de rata cuya expresión se limita a hígado y tejido adiposo, y que es controlado por factores hormonales y nutricionales.

Se ha encontrado expresado en cáncer de mama lipogénico, lo que sugiere que tiene un papel en el control del metabolismo lipídico tumoral (Moncur y col., 1998). Este gen (THRSP) se ha considerado como un marcador de cáncer de mama agresivo, encontrado en tumores mamarios lipogénicos, que tienen un mal pronóstico, ya que suelen presentar también elevada la expresión de FAS (Fatty Acid Synthase). En estos tumores de mama

lipogénicos con receptores de progesterona, la progestina induce la expresión tanto de THRSP como de FAS promoviéndose el crecimiento tumoral acelerado. Sin embargo, el bloqueo de este gen origina apoptosis (Kinlaw y col., 2006). Además, la alta expresión de THRSP en tumores mamarios invasivos es indicativo de una menor supervivencia de los individuos (Wells y col., 2006). Por tanto, la sobreexpresión de este gen en tumores lipogénicos está relacionado con una mayor producción de lípidos, y con un mayor crecimiento tumoral como se ha visto en líneas celulares MCF-7 (Martel y col., 2006).

Estas observaciones sobre la relación entre THRSP y el cáncer de mama no se han llevado a cabo tras el tratamiento con adriamicina. En nuestro modelo encontramos que en los tumores no tratados, la expresión no varía con respecto al inicio del estudio (según el estudio de microarray, ya que este gen no ha sido confirmado mediante RTPCR para dicho grupo). Esta situación difiere de lo que ocurre en los animales tratados con ADR, en los que la expresión se eleva de forma visible con respecto al momento pretratamiento. Esto sugiere que el tratamiento ocasiona un aumento en la expresión de enzimas lipogénicas, que está de acuerdo con los elevados niveles de lípidos plasmáticos determinados en los animales tratados con ADR, facilitándose en cierto modo el crecimiento tumoral, pudiendo ser un efecto adverso de la quimioterapia.

Los estudios demuestran que los inhibidores de la Topoisomerasa II α (TOP2A) como la doxorubicina, promueven la sobreexpresión de FAS (Fatty Acid Synthase) en células de cáncer de mama SK-Br3 que sobreexpresan Her-2/neu. Así pues, la sobreexpresión de la ácido graso sintasa tras la adición de antraciclinas, es un marcador que sustituye a la expresión de TOP2A como indicativo de la acción de dichos inhibidores en carcinomas de mama que sobreexpresan Her-2/neu. Además, es interesante observar cómo las combinaciones quimioterapéuticas de bloqueadores de la enzima FAS e inhibidores de TOP2A no es lo ideal, ya que tal inhibición de FAS provoca una disminución de la diana sobre la que debería actuar TOP2A, demostrando que no hay sinergismo alguno (Menendez y col., 2006).

A la luz de estos resultados surgen preguntas que merecen contestación mediante futuros estudios: ¿Tendrá relación alguna la adriamicina con THRSP del mismo modo

que la que presenta con FAS? ¿Tendrá que ver con el estado de HER-2/neu? ¿Mejoraría el grado de eficacia de la quimioterapia aplicando antagonistas de enzimas del metabolismo lipídico como THRSP en cáncer de mama lipogénico, a diferencia de lo que parece ocurrir con el bloqueo combinado de FAS?

Reducción del escape inmune por la represión de EGR3 por la adriamicina.

EGR3 (early growth response 3) presentó una expresión disminuida tras el tratamiento con adriamicina (FC: 0.46; P=0.049. Estudio de RTPCR). EGR3 es un factor de transcripción que tiene un papel importante en el crecimiento y diferenciación celular. Su expresión está mediada por los estrógenos, y su inmunoreactividad se relaciona con la expresión del receptor de estrógenos alfa. El mecanismo propuesto, es que tras su expresión inducida por los estrógenos, EGR3 a su vez induce la expresión de varios factores relacionados con el crecimiento, escape inmune, invasión y metástasis de las células de cáncer de mama, como por ejemplo el FAS ligando (FasL, ligando del receptor muerte FAS). Dicho ligando puede ser fabricado por el tumor para producir la apoptosis de las células inmunes y vecinas sensibles a FAS, escapando de la respuesta inmune y seleccionando clones más agresivos (Reimer y col., 2000; Yakirevich y col., 2000).

Cómo se acaba de comentar, EGR3 está implicado en la ruta de los estrógenos. El tamoxifeno inhibe la expresión de EGR3, siendo además un buen factor pronóstico de invasividad y malignidad del cáncer de mama dependiente de estrógenos (Suzuki y col., 2007; Hayashi y Yamagushi, 2008). Así pues, si la adriamicina disminuye la expresión de este gen, esto sería un indicador de buen pronóstico. Además de este mecanismo, este gen está implicado en la ruta de señalización de VEGF facilitando la angiogénesis (Liu et al., 2008). No hay estudios anteriores que demuestren la disminución de la expresión de EGR3 por parte de la adriamicina cómo lo hace el tamoxifeno (Hayashi y Yamagushi, 2008). Por tanto, las razones por las cuales esto ocurre aún no se pueden explicar, quedando pendiente tal explicación en futuras investigaciones.

La adriamicina no parece bloquear el ciclo celular en la fase G0/G1.

La adriamicina no sólo produce efectos secundarios asociados a su agresividad cómo buen fármaco de quimioterapia. Hay veces en las que esta antraciclina parece no tener

efecto sobre la expresión de ciertos genes que codifican proteínas relacionadas con eventos apoptóticos, y cuya falta de expresión ocurre en el cáncer de mama inducido con DMBA. Este es el caso del factor de transcripción TEF que se encuentra reprimido tras el tratamiento con ADR (FC: 0.52; $P=0.0236$. Estudio de RTPCR). Dicho factor induce la transactivación de TSHB (hormona estimulante del tiroides), y se ha visto que induce la detención del ciclo en G0/G1 de células de leucemia impidiendo la apoptosis celular (Inukai y col., 2005). Al estar inhibido (cómo es nuestro caso) no produce la parada en el ciclo celular G0/G1, resultado que está de acuerdo con el modo de acción de los inhibidores de la topoisomerasa (Sausville y Longo, 2006), facilitando la supervivencia de las células tumorales en esta fase. No obstante, que la adriamicina no detenga el ciclo celular en la fase G0/G1 no quiere decir que no lo haga en ninguna fase. En este sentido, se debe recordar que la represión de CDC25B por parte de la ADR causa un bloqueo en la fase G2/M.

La represión de GIT2 favorece el aumento de radicales libres generados por la adriamicina.

Como consecuencia de la reducida expresión de GIT2 (G protein-coupled receptor kinase-interactor 2) (FC: 0.76; $P=0.0004$. Estudio de RTPCR) se produce un aumento en la producción de radicales libres cómo anión superóxido (Mazaki y col., 2006; Sabe y col., 2006). Además de la reducción en la síntesis de glutatión cómo consecuencia de la menor expresión de GCLC (glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit) (Aiba y col., 2008; Han y col., 2008). Esta situación provoca un aumento en los radicales libres intracelulares y una menor capacidad de la célula para eliminarlos. Mostrándonos un nuevo mecanismo que puede arrojar luz sobre uno de los mecanismos de acción de la adriamicina, la elevada producción de ERO.

Otras vías aparentemente no afectadas por el tratamiento con adriamicina.

Al igual que ocurre en el grupo HT, la adriamicina no parece tener efecto sobre la expresión de ciertos genes. El gen CCNL2 presenta una transcripción reducida (FC: 0.5; $P=0.0043$. Estudio de RTPCR) al igual que ocurre en los grupos HT y DMBA, lo cual podría indicar que no es un gen clave. Por otra parte, para el gen NHN1 sirve lo mismo expuesto para este gen en el grupo HT. Por último, la expresión de OGFRL1 (opioid

growth factor receptor-like 1) (FC: 1.3; $P=0.035$. Estudio de RTPCR) no constituye un gen con aparente importancia en el estudio que se presenta.

V.4.- GENES CONFIRMADOS EN EL GRUPO DMBA.

A continuación se revisan aquellos genes validados para el grupo DMBA y que están implicados en la disminución de la apoptosis, promoción de la proliferación celular, y en definitiva en los diferentes aspectos relacionados con el mecanismo de acción del 7,12-dimetilbenzo(α)antraceno (DMBA).

El DMBA bloquea la capacidad inhibidora tumoral de GABA.

Entre los genes implicados en el crecimiento celular que se hallan en nuestro modelo de DMBA se encuentra el que codifica para el receptor Gaba-B (GABBR1) y que se encuentra reprimido (FC: 0.49; $P=0.0201$. Estudio de RTPCR). Es una proteína receptora de GABA implicada en el crecimiento tumoral. En este modelo, el bajo nivel de expresión de este receptor indica que los procesos inhibidores del crecimiento tumoral por parte de GABA se encuentran bloqueados. Por tanto el crecimiento tumoral se ve favorecido. Esta afirmación se basa en que los antagonistas de este receptor (ej. Baclophen) tienen efecto inhibidor del crecimiento de tumores mamarios (Opolski y col., 2000).

Mayor crecimiento celular inducido por hormonas mediado por la represión del DMBA sobre NNAT.

Otro mecanismo que se puede corroborar mediante el estudio de expresión génica es el que promueve el crecimiento celular inducido por hormonas y mediado por NNAT (neuronatin). La menor expresión de esta secuencia en el grupo control de DMBA (FC: 0.56; $P=0.0144$. Estudio de RTPCR) no está en la línea marcada por Papaconstantinou y colaboradores, en la que NNAT ve aumentada su expresión (Papaconstantinou y col., 2006). Esto puede ser debido a que estos autores llevan a cabo el análisis tumoral 6 semanas después de administrar el carcinógeno, que también es DMBA. De este modo, las lesiones objeto de estudio son preneoplásicas, que distan de los carcinomas mamarios obtenidos en el modelo que se discute en esta memoria de tesis doctoral.

Esta secuencia génica (NNAT) codifica una proteína relacionada con el crecimiento celular regulado por hormonas (Uchihara y col., 2007) que se ha encontrado hipermetilado en células de cáncer de próstata (Yamashita y col., 2008) y en leucemia pediátrica aguda (Kuerbitz y col., 2002). Su sobreexpresión se ha correlacionado con un mejor pronóstico en cáncer de pulmón de células pequeñas (Uchihara y col., 2007), neuroblastoma (Higashi y col., 2007), así como en células de carcinoma mamario resistentes al tamoxifeno (Becker y col., 2005), etc. En cáncer de mama aún no se conoce la implicación de esta proteína, y menos aún en el inducido por DMBA. Sin embargo, en relación a esto, se ha visto que suele estar hipermetilado en diferentes tipos de cánceres, pudiendo dar la pista de que en nuestro modelo también se encuentre metilado como consecuencia de las propiedades tumorales del DMBA. Esta podría ser la razón por la cual está inhibido en nuestro estudio.

El DMBA favorece la progresión del ciclo celular y la proliferación al reprimir a MAX e incrementar a ID1.

La progresión del ciclo celular implica que hay proliferación. Con relación a esto, la inhibición en el modelo de DMBA de la proteína MAX (FC: 0.76; P=0.0218. Estudio de RTPCR) indica que las células están entrando en la fase G1 del ciclo celular. Tal represión de MAX está íntimamente relacionada con la sobreexpresión de Myc y la inhibición de un supresor tumoral de la misma familia que las dos anteriores, Mnt (Hooker y Hurlin, 2006).

Con una expresión elevada (FC: 2.17; P=0.0239. Estudio de RTPCR) se encuentra ID1 (inhibitor of DNA binding 1). Se trata de un gen que codifica una proteína que promueve la proliferación y el avance del ciclo celular. Se encuentra sobreexpresado en numerosos cánceres, lo que está relacionado con estados avanzados de la enfermedad. Además, se caracteriza por sacar a las células del estado de senescencia replicativa inducida por supresores tumorales como p16. De hecho, el aumento en la expresión de ID1 disminuye la de los supresores como p16 (CDKN2A) o Rb. Además se ha propuesto que promueve el crecimiento celular en respuesta a mitógenos, siendo diana corriente abajo de la familia MAPK. Concretamente se ha estudiado que la expresión de ID1 se induce a través del miembro de la familia MAPK pro crecimiento llamado EGR1 (uno de

los miembro de la familia EGR, junto a EGR3 estudiado en ADR). ID1 es un oncogén asociado a la malignidad, proliferación incontrolada, resistencia a la apoptosis y metástasis de los tumores, entre los que se encuentran los mamarios (Wong y col., 2004; Ling y col., 2006). Por otra parte, también protege a las células de la apoptosis mediada por la quimioterapia (Zhang X y col., 2007).

El DMBA podría reducir la apoptosis mediada por la serotonina.

El DMBA inhibe la expresión de un que parece estar relacionado con la apoptosis, SLC6A4 [(solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4)] (FC: 0.54; $P=0.0018$. Estudio de RTPCR). Codifica una proteína integral de membrana que se encarga de transportar serotonina al interior celular. La serotonina (5-hidroxitriptamina) además de las funciones típicas en el sistema nervioso cómo neurotransmisor, ha demostrado tener capacidad apoptótica en células de linfoma (Meredith y col., 2005).

En el cáncer de mama se está estudiando la interacción de los inhibidores de la reabsorción de serotonina (ej. escitalopram) con el metabolismo del tamoxifeno y el incremento en el riesgo de cáncer de mama, así como por su propio uso. No obstante aún no se han encontrado evidencias epidemiológicas que avalen esta hipótesis (Coogan y col., 2008; Lash y col., 2008). La inhibición de SLC6A4 por el DMBA podría ser un motivo por el cual la serotonina no pudiera llevar a cabo su posible actividad apoptótica en contra de las células tumorales, tal como lo hace frente a las de linfoma. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser convenientemente estudiada.

La expresión de ciertos genes determina la aparición o no de metástasis en el modelo DMBA.

Otro gen que codifica factores relacionados con la supervivencia a la apoptosis en células endoteliales vasculares es ANGPTL4 (angiopoietin-like 4), que se encuentra aumentado en el grupo DMBA (FC: 2.14; $P=0.0190$. Estudio de RTPCR). Este gen codifica una proteína ampliamente estudiada en el metabolismo de lípidos y glucosa, inhibiendo la lipoproteín lipasa y aumentando los niveles séricos de VLDL. Se encuentra inducido en situaciones de hipoxia y es diana de los PPAR. Aunque en ciertas situaciones

se ha visto que es un inhibidor de la angiogénesis, en otras ha mostrado actividad inductora de tal, denotando una actividad tejido-específica. Además, ha resultado ser un mediador de la metástasis de células de cáncer de mama hasta el pulmón. Con respecto a esto último, la expresión es estimulada por TGF β , lo que facilita la entrada de las células a los vasos y su posterior salida a los pulmones (Padua y col., 2008). Al igual que ocurre en el grupo ADR, en el de DMBA también aparece inhibido el gen TEF con respecto al momento pretratamiento. Este hecho indica que las células tienen otro factor en su favor para escapar de los mecanismos de control celular, como es en este caso, la apoptosis, favoreciéndose su supervivencia.

Además de los genes ya estudiados, hay uno en particular que aún sigue presentando muchas dudas sobre su papel en la carcinogénesis mamaria. Se trata de S100A9 [(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)], un miembro de las proteínas S100 de unión de calcio. Este gen presenta un papel promotor en muchos cánceres, aunque se ha descrito un posible papel supresor en otros como el de mama de células mioepiteliales. Sin embargo, sigue siendo un misterio el porqué siempre está sobreexpresado en las neoplasias mamarias, como también ocurre con otros miembros como S100A6. Éste último se ha descrito que está sobreexpresado en modelos de carcinogénesis mamaria en ratas con DMBA (Papaconstantinou y col., 2006). Estos resultados están en concordancia con el obtenido en el presente trabajo (FC: 2.84; $P=0.0466$. Estudio de RTPCR). Además, la proteína que codifica se ha visto que favorece la movilidad celular y que actúa como quimioatrayente. Esto facilita la llegada de células tumorales a los sitios premetastásicos en el parénquima pulmonar, además de ser un marcador de poca diferenciación celular y por tanto de mal pronóstico en adenocarcinomas mamarios (Salama y col., 2008).

La capacidad metastásica del modelo de DMBA se ve aumentada si tenemos en cuenta que la disminución en la expresión (como la que se presenta en nuestro estudio) de MYH9 (myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle) (FC: 0.68; $P=0.0107$. Estudio de RTPCR) conduce a la estabilización de microtúbulos y aumenta la capacidad metastásica de las mismas (Even-Ram y col., 2007). Además, la proteína codificada por este gen ejerce su acción regulada a través de S100A4, un miembro de la familia prometastásica a la que pertenece S100A9 (Dulyaninova y col., 2007). Esta relación MYH9-S100A4 podría darse

también con la proteína S100A9 encontrada en nuestro modelo. Papaconstantinou y colaboradores encontraron una disminución en la expresión de otros miembros de la familia de MYH9, así por ejemplo, MYH4 o MYH6 vieron su transcripción reducida 6 semanas después de la administración de DMBA (Papaconstantinou y *col.*, 2006).

En relación a factores relacionados con la metástasis, hay que indicar que además de ANGPTL4, S100A9 y MYH9, hay otros genes que guardan relación con la metástasis y que se han validado en el grupo tratado con DMBA. Por un lado se encuentra la PCDHA4 (protocadherin alpha 4), que a pesar de no estar relacionada con el cáncer de mama, en general, las protocaderinas se han estudiado cómo proteínas encargadas de la interacción célula-célula (aunque a nivel de neuronas) (Mungenast y Ojeda, 2005). La alta expresión de PCDHA4 en el modelo de DMBA (FC: 2.30; $P=0.0174$. Estudio de RTPCR) podría estar relacionada con la baja tasa de metástasis que presenta el modelo (Thompson y Singh, 2000).

Lo anterior se suma a la baja expresión de genes derivados de los mastocitos que se encuentran en nuestro estudio. Estos, además de estar relacionados con la inflamación, también tienen que ver con la ruptura de las estructuras que soportan a las células, facilitando su movilidad y por tanto la metástasis. Este es el caso del gen de la triptasa TPSAB1 (FC: 0.30; $P=0.0120$. Estudio de RTPCR) y del de la quimasa CMA1 (FC: 0.45; $P=0.0208$. Estudio de RTPCR), procedentes de los mastocitos, relacionadas con la metástasis y la inflamación (Amini y *col.*, 2007; Caughey, 2007). Por otra parte, la reducida expresión del antígeno de superficie de los mastocitos encontrada en el grupo control de DMBA (MCA32) (FC: 0.60; $P=0.0442$. Estudio de RTPCR), indica que estos mastocitos no se encuentran muy activos (Pirozzi y *col.*, 1995). Por tanto es normal que las anteriores secuencias (TPSAB1 y CMA1) no se presenten una transcripción elevada.

Además de estos factores, la baja expresión de nexilina (NEXN) encontrada en el grupo DMBA (FC: 0.58; $P=0.0147$. Estudio de RTPCR) indica que las células tumorales no están en programa metastásico, ya que la depleción de ésta reduce la movilidad celular (Wang y *col.*, 2005).

En conjunto, el estudio de todos estos genes indica nos muestra que este modelo no es predominantemente metastásico, pero que hay factores que podrían provocarla. Se trata pues de un equilibrio que muy probablemente se terminará rompiendo a largo término a favor de la metástasis.

La menor expresión de PGR podría indicar agresividad tumoral.

Un gen cuya expresión está disminuida en el grupo de DMBA y que no ha sido validada en los otros dos grupos su menor expresión detectada por microarray es el PGR (receptor de progesterona) (FC: 0.41; $P=0.0190$. Estudio de RTPCR). Este gen codifica el receptor de progesterona, cuya sobreexpresión está implicada en el desarrollo del cáncer de mama. De hecho, Marxfeld y colaboradores encuentran una sobreexpresión de hasta 14.92 (Marxfeld y col., 2006a; Marxfeld y col., 2006b). Que en nuestro estudio se vea disminuida la expresión de PGR con respecto al momento inicial no quiere decir que en comparación con un tejido sano esté bajo. Podría presentar una expresión aumentada, aunque para saber si está realmente incrementada se debería comparar la expresión de este receptor en los tumores con respecto a tejido mamario sano. No obstante, queda claro que la expresión de PGR ha disminuido con respecto al momento de la biopsia. Dicha pérdida podría estar relacionada con un aumento en la agresividad tumoral, promoviendo vías de supervivencia como AKT, al reducirse la expresión de su supresor PTEN e incrementarse la expresión de HER2/neu (Bedard y col., 2008).

El modelo de DMBA favorece la inflamación.

Los procesos inflamatorios tienen una especial importancia en el desarrollo del cáncer (Cornwell y Ma, 2008). En nuestro modelo el incremento de LTC4S (leukotriene C4 synthase) (FC: 1.76; $P=0.0256$. Estudio de RTPCR) indica que la síntesis de leucotrienos de la serie 4 a partir de ácido araquidónico podría estar elevada. Dichos leucotrienos median procesos inflamatorios (Iovannisci y col., 2007) y facilitan el desarrollo tumoral. La transcripción de LTC4S puede ocurrir como consecuencia de la presencia de citoquinas, como ocurre con TGF β en macrófagos (Riddick y col., 1999).

El modelo de carcinogénesis mamaria usando DMBA podría estar influenciado por la inhibición del gen PER2 y de CCLN2.

El gen PER2 (Period homolog 2) codifica una proteína clave del ritmo, y contribuye a la regulación circadiana de la transcripción de genes corriente abajo y de sí mismo (Rosbash y Takahashi, 2002). La relación que guarda con el cáncer ha sido ampliamente documentada a lo largo de los años, e incluso se le ha llegado a nombrar como supresor de tumores. Se ha visto que la expresión de PER2 en células de cáncer produce una inhibición del crecimiento celular, parada del ciclo celular, apoptosis y pérdida de la habilidad clonogénica. Estudio realizados en ratones maduros con el gen PER2 dañado aparecieron glándulas salivares hiperplásicas. Ratones con PER2 mutante desarrollaban linfomas espontáneos y además eran más sensibles al estrés genotóxico (radiación gamma). Un estudio demostró que el 95% de los tumores de mama presentaban niveles de PER1 y PER2 inhibidos. (Fu y col., 2002; Moser y col., 2006; Chen-Goodspeed y Lee, 2007). Así pues, la inhibición de la expresión en el grupo DMBA (FC: 0.37; $P=0.0037$. Estudio de RTPCR) muestra un mecanismo a través del cual el DMBA favorece la carcinogénesis mamaria.

Por otra parte, la inhibición de la transcripción del gen CCNL2 (cyclin L2) (FC: 0.62; $P=0.0084$. Estudio de RTPCR) está relacionada con la reducción de la apoptosis (Li HL y col., 2007). Este hecho constituye un punto de apoyo para la proliferación celular mediada por el DMBA.

Otras vías aparentemente no relacionadas con la carcinogénesis del DMBA.

El factor de crecimiento endotelial llamado betacelulina (BTC), presenta una expresión menor en el grupo DMBA (FC: 0.33; $P=0.0288$. Estudio de RTPCR). Este gen codifica una proteína que se une a los receptores EGFR y Erb para llevar a cabo sus efectos encaminados al crecimiento (Révillion y col., 2008). La inhibición de la expresión de la betacelulina en el modelo de DMBA podría indicar que este mecanismo no es prioritario en dicho modelo desde el punto de vista de la tumorigénesis. En los estudios realizados sobre ratas con tumores mamarios inducidos con DMBA, tampoco aparece la

betacelulina, sin embargo, si es más normal que aparezcan otros factores de crecimiento cómo la ampirregulina (Marxfeld y *col.*, 2006a; Marxfeld y *col.*, 2006b).

Por último, la leve disminución en la expresión de RNPS1 (Ribonucleic acid binding protein S1) (FC: 0.85; $P=0.048$. Estudio de RTPCR) nos muestra que las células tumorales continuarían siendo alteradas genéticamente. Esto es así porque la reducción en la transcripción de RNPS1 provoca una incapacidad de reparar las roturas dobles de ADN. Además se produce un aumento en la inestabilidad genómica provocado por la alteración en la función del factor de corte y empalme 2 (ASF/SF2) (Li X y *col.*, 2007). Cabe la posibilidad de que simplemente, esta ruta no sea una vía típica de carcinogénesis de este modelo.



Conclusiones

CONCLUSIÓN PRIMERA.

El hidroxitirosol presenta capacidad antitumoral en ratas con cáncer de mama inducido con DMBA, disminuyendo de forma significativa el volumen tumoral y la proliferación de las células cancerígenas, además de reducir la progresión hacia grados histopatológicos superiores.

CONCLUSIÓN SEGUNDA.

El hidroxitirosol no altera de forma significativa los parámetros bioquímicos plasmáticos. El tratamiento combinado del mismo con adriamicina no supone una mejora significativa de los efectos oxidativos promovidos por el fármaco.

CONCLUSIÓN TERCERA.

El tratamiento con hidroxitirosol altera los patrones de expresión génica en los tumores. Estos estudios nos llevan a proponer los siguientes mecanismos de acción del hidroxitirosol: 1) bloqueo de la vía de señalización de supervivencia y proliferación celular Wnt, 2) apoptosis ayudada por una probable estimulación del sistema inmune, 3) detención del ciclo celular, 4) descenso de los reservorios de lípidos destinados a la proliferación celular como consecuencia del incremento de la expresión de genes implicados en la β -oxidación, 5) bloqueo y disminución de los niveles de factores de transcripción implicados en procesos oncogénicos.

CONCLUSIÓN GENERAL.

El estudio que aquí se presenta demuestra por primera vez un potente efecto antiproliferativo del hidroxitirosol en animales de experimentación con cáncer de mama inducido con DMBA. Se trata de un componente minoritario del aceite de oliva virgen cuya acción antitumoral se asemeja al de la adriamicina, pero sin provocar sus efectos adversos. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con la alteración de la

expresión de genes implicados en procesos biológicos relevantes para la supervivencia y proliferación de las células tumorales.



Resumen

Antecedentes bibliográficos: El cáncer de mama es una enfermedad con una etiología variada y una enorme cantidad de factores de riesgo como la dieta, hormonas, ambientales, etc. La incidencia mundial sigue creciendo, aunque la mortalidad y morbilidad ha disminuido en los últimos años debido a la detección precoz y mejoras en las pautas de tratamiento. La adriamicina continúa siendo uno de los fármacos más usados y eficaces en esta patología, de hecho está presente en la mayoría de los regímenes terapéuticos, sin embargo el uso de esta antraciclina conlleva la aparición de multitud de efectos adversos (cardiopatías, nefropatías, etc.) derivados en gran parte del estrés oxidativo tan elevado que genera, razón por la cual la terapia preventiva con el uso de antioxidantes que mitiguen su toxicidad está en pleno auge. El aceite de oliva es conocido por la gran cantidad de sustancias antioxidantes que contiene, una de ellas es el hidroxitirosol, un compuesto fenólico que además de poseer una elevada capacidad antioxidante al eliminar eficazmente los radicales libres, presenta acción anticancerígena en cultivos celulares, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiagregante plaquetario, etc., sin mostrar toxicidad asociada a elevadas dosis en animales y humanos.

Justificación y objetivos: El enorme estrés oxidativo derivado del tratamiento con adriamicina (ADR) ocasiona daños tanto a las células tumorales como a las sanas, causando una gran variedad de efectos tóxicos; puesto que el hidroxitirosol (HT) se ha mostrado como un gran agente antioxidante con acción antiproliferativa en líneas celulares tumorales, el objetivo del presente trabajo es comprobar si la terapia combinada de adriamicina e hidroxitirosol (ADR+HT) reduce la toxicidad asociada a la antraciclina, sin disminuir o incluso potenciando la acción antitumoral de la misma. Por otra parte, se quiere constatar por primera vez en ratas con cáncer de mama si dicho antioxidante mantiene la capacidad antitumoral que presenta en cultivos celulares.

Material y métodos: Para realizar el estudio se emplearon 44 ratas Sprague-Dawley hembras distribuidas de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales: DMBA (grupo control con cáncer de mama), HT (grupo tratado con hidroxitirosol), ADR (grupo tratado con adriamicina), ADR+HT (grupo de terapia combinada) y CONTROL (grupo control sano sin cáncer). El cáncer de mama se indujo con una única dosis de 100mg/kg de DMBA (7,12-dimetilbenzo(α)antraceno) vía intragástrica. El hidroxitirosol se administró

vía oral a una dosis de 0.5mg/kg/día, 5 días durante 6 semanas. La adriamicina se inyectó a través de la vena lateral de la cola a una dosis de 1mg/kg/semana durante 6 semanas. Se realizó una biopsia del primer tumor que alcanzó un volumen de 2cm³, y finalizados los tratamientos se sacrificaron los animales siguiendo el protocolo del Comité Ético de la Universidad de Granada. Se midieron los parámetros bioquímicos, oxidativos, niveles del antioxidante en plasma, pesos de los animales, parámetros tumorales, anatomía patológica y proliferación celular. Además se realizó un estudio de perfil genético mediante microarray en las muestras de tumores biopsiados en el momento inicial y al sacrificio. Los resultados obtenidos fueron validados mediante RTPCR cuantitativa.

Resultados: Los grupos ADR y ADR+HT presentan un aumento del perfil lipídico (significativo para el primero pero no para el segundo) con respecto a los grupos CONTROL, HT y DMBA. En cuanto a la capacidad antioxidante plasmática, no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales. El ensayo comet indica una tendencia a la reducción de la genotoxicidad tanto del HT solo como en combinación con la ADR, aunque tal descenso no es estadísticamente significativo entre los diferentes grupos. Además el antioxidante tiende a normalizar los niveles plasmáticos de coenzima Q₉ (aunque no estadísticamente significativo) y Q₁₀ (estadísticamente significativo) reducidos en ADR. Algo similar sucede con el tocoferol, que se encuentra elevado en el grupo ADR y el hidroxitirosol normaliza los niveles, haciéndolos similares a los del grupo CONTROL. En plasma se ha encontrado mayoritariamente hidroxitirosol (que fue mayor en el grupo HT que en ADR+HT) y la menor presencia la tiene el alcohol homovanílico, siendo superior en el grupo HT que ADR+HT. El grupo DMBA es el que mayor peso de los animales presenta, siendo significativo con respecto a ADR y ADR+HT (sin diferencias estadísticas significativas entre estos). El grupo HT presenta un peso superior que los grupos ADR y ADR+HT, e inferior que el de DMBA, aunque no es estadísticamente significativo para ambos casos. El HT retiene el crecimiento de los tumores mamarios de las ratas. Tanto a nivel de tumor trucut como del total de carcinomas el volumen no aumenta como en el caso del grupo DMBA, llegando incluso a compararse el volumen tumoral total con el que presenta los grupos ADR y ADR+HT. Además la combinación ADR+HT no afecta en modo alguno la capacidad antitumoral de la antraciclina, incluso hay un efecto sinérgico.

El estudio de proliferación celular mediante la inmunotinción de Ki67 indica que el hidroxitirosol disminuye en la misma medida que la adriamicina y la combinación de ambos la presencia de Ki67 y por tanto la proliferación de las células tumorales. Desde el punto de vista histopatológico, los tumores mamarios inducidos con DMBA de nuestro trabajo presentan patrón cribiforme predominante y grados I y II fundamentalmente. Ni la ADR ni el HT combinado o no con la antraciclina evitan por completo el progreso de los tumores hacia grados superiores y otros patrones arquitecturales, aunque si lo disminuyen visiblemente. El HT parece ser el compuesto que menos promueve el aumento del grado de Bloom-Richardson con el paso del tiempo, e incluso la combinación con la ADR lo disminuye con respecto a la antraciclina sola. El estudio de perfil génico indica la presencia de genes implicados en apoptosis, proliferación, diferenciación, ciclo celular, oncogénesis, inmunidad, inflamación, defensa celular, metabolismo lipídico y oncogénesis, cuya expresión ha sido posteriormente validada mediante RTPCR cuantitativa. Tanto el análisis de microarray como la PCR indican elevada variabilidad entre las muestras analizadas de cada grupo estudiado con estas técnicas (HT, ADR, DMBA).

Conclusiones: 1) El hidroxitirosol presenta capacidad antitumoral en ratas con cáncer de mama inducido con DMBA, disminuyendo de forma significativa el volumen tumoral y la proliferación de las células cancerígenas, además de reducir la progresión hacia grados histopatológicos superiores. 2) El hidroxitirosol no altera de forma significativa los parámetros bioquímicos plasmáticos. El tratamiento combinado del mismo con adriamicina no supone una mejora significativa de los efectos oxidativos promovidos por el fármaco. 3) El tratamiento con hidroxitirosol altera los patrones de expresión génica en los tumores. Estos estudios nos llevan a proponer los siguientes mecanismos de acción del hidroxitirosol: a) bloqueo de la vía de señalización de supervivencia y proliferación celular Wnt, b) apoptosis ayudada por una probable estimulación del sistema inmune, c) detención del ciclo celular, d) descenso de los reservorios de lípidos destinados a la proliferación celular como consecuencia del incremento de la expresión de genes implicados en la β -oxidación, e) bloqueo y disminución de los niveles de factores de transcripción implicados en procesos

oncogénicos. 4) El tratamiento con hidroxitirosol altera los patrones de expresión génica de las células tumorales y ejerce su acción antitumoral en cinco frentes: a) bloqueo de la vía de señalización de supervivencia y proliferación celular Wnt, b) apoptosis ayudada por una probable estimulación del sistema inmune, c) deteniendo el ciclo celular, d) bloqueo y disminución de los niveles de factores de transcripción implicados en procesos oncogénicos, e) descenso de los reservorios de lípidos destinados a la proliferación celular por el incremento de la β -oxidación. **CONCLUSIÓN GENERAL.** El estudio que aquí se presenta demuestra por primera vez un potente efecto antiproliferativo del hidroxitirosol en animales de experimentación con cáncer de mama inducido con DMBA. Se trata de un componente minoritario del aceite de oliva virgen cuya acción antitumoral se asemeja al de la adriamicina, pero sin provocar sus efectos adversos. Su mecanismo de acción podría estar relacionado con la alteración de la expresión de genes implicados en procesos biológicos relevantes para la supervivencia y proliferación de las células tumorales.



Perspectivas

I.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.

El trabajo presentado en esta memoria de tesis doctoral será continuado en estudios posteriores. La finalidad de éstos será conocer los efectos del hidroxitirosol en otros modelos, como el empleo de ratones a los que se implantarán líneas primarias de células tumorales de mama. Además, sería conveniente extender los conocimientos sobre el mecanismo de acción propuesto para el hidroxitirosol. Para ello, habrá que confirmar los resultados obtenidos en el estudio aquí presentado a nivel proteico usando técnicas de inmunohistoquímica. Por otra parte, sería interesante observar los efectos del silenciado de aquellos genes implicados en el mecanismo de acción propuesto para el hidroxitirosol mediante el uso de ARNsi. Además, el estudio sobre qué molécula (hidroxitirosol sólo, algún metabolito o ambos) ejerce la acción antitumoral sería muy interesante. Para ello, se podrían emplear técnicas de imagen con el fin de observar la distribución tumoral de cada una de esas moléculas marcadas con isótopos radiactivos. En función de la mayor o menor distribución se podría sospechar cuál es el principal causante de la regresión tumoral y de la alteración en la expresión génica.

Estas futuras investigaciones se podrán llevar a término con la inestimable ayuda de las correspondientes subvenciones, sumamente necesarias para que este campo siga dando tan buenos resultados.

A decorative graphic on the left side of the page. It features a central cluster of blue and white spheres, possibly representing a molecular structure or a cell. To the left of this cluster are several laboratory flasks and beakers. Above the flasks are some small 'x' marks and a plus sign. To the right of the central cluster is a large, textured blue sphere. Below the central cluster is a small diagram of a DNA double helix. The entire graphic is rendered in shades of blue and white.

Bibliografía

A

- Abbadessa G, Spaccamiglio A, Sartori ML, Nebbia C, Dacasto M, Di Carlo F, Racca S. The aspirin metabolite, salicylate, inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adduct formation in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2006; 28(5):1131-1140.
- Abd-Ellah MF, Mariee AD. Ginkgo biloba leaf extract (EGb 761) diminishes adriamycin-induced hyperlipidaemic nephrotoxicity in rats: association with nitric oxide production. *Biotechnol Appl Biochem.* 2007; 46(Pt 1):35-40.
- Abu-Jawdeh G, Comella N, Tomita Y, Brown LF, Tognazzi K, Sokol SY, Kocher O. Differential expression of frpHE: a novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. *Lab Invest.* 1999; 79(4):439-447.
- Acín S, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, Guillén N, Sarría AJ, Carnicer R, Surra JC, Orman I, Segovia JC, Torre RL, Covas MI, Fernández-Bolaños J, Ruiz-Gutiérrez V, Osada J. Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice. *J Biochem.* 2006; 140(3):383-391.
- Adam MP, Chueh J, El-Sayed YY, Stenzel A, Vogel H, Weaver DD, Hoyme HE. Vascular-type disruptive defects in fetuses with homozygous alpha-thalassemia: report of two cases and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2005; 25(12):1088-1096. Review.
- Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Peralta-Leal A, Quiles-Pérez R, Rodríguez-Vargas JM, de Almodóvar MR, Conde C, Ruiz-Extremera A, Oliver FJ. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. *Curr Med Chem.* 2007; 14(11):1179-1187. Review.
- Aiba I, Hossain A, Kuo MT. Elevated GSH level increases cadmium resistance through down-regulation of Sp1-dependent expression of the cadmium transporter ZIP8. *Mol Pharmacol.* 2008; 74(3):823-833.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell.* 4rd Edition. Taylor & Francis Group, New York. 2002.
- Alleva R, Tomasetti M, Andera L, Gellert N, Borghi B, Weber C, Murphy MP, Neuzil J. Coenzyme Q blocks biochemical but not receptor-mediated apoptosis by increasing mitochondrial antioxidant protection. *FEBS Lett.* 2001; 503(1):46-50.
-

- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Clausen LM, Doerge DR, Schantz SL, Korol DL, Wallig MA, Helferich WG. Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*. 2004; 25(2):211-218.
- Alvarado M, Ewing CA, Elyassnia D, Foster RD, Shelley Hwang E. Surgery for palliation and treatment of advanced breast cancer. *Surg Oncol*. 2007; 16(4):249-257. Review.
- Amini RM, Aaltonen K, Nevanlinna H, Carvalho R, Salonen L, Heikkilä P, Blomqvist C. Mast cells and eosinophils in invasive breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2007; 7:165-170.
- Anbuselvam C, Vijayavel K, 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; 168(3):229-236.
- Arlt A, Grobe O, Sieke A, Kruse ML, Fölsch UR, Schmidt WE, Schäfer H. Expression of the NF-kappa B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in Hela cells. *Oncogene*. 2001; 20(1):69-76.
- Arlt A, Kruse ML, Breitenbroich M, Gehrz A, Koc B, Minkenberg J, Fölsch UR, Schäfer H. The early response gene IEX-1 attenuates NF-kappaB activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death. *Oncogene*. 2003; 22(21):3343-3351.
- Arlt A, Rosenstiel P, Kruse ML, Grohmann F, Minkenberg J, Perkins ND, Fölsch UR, Schreiber S, Schäfer H. IEX-1 directly interferes with RelA/p65 dependent transactivation and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783(5):941-952.
- Aronis A, Melendez JA, Golan O, Shilo S, Dicter N, Tirosh O. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by attenuated production of mitochondria-derived reactive oxygen species. *Cell Death Differ*. 2003; 10(3):335-344.
- Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett*. 2007; 581(19):3665-3674. Review.
-

Arulkumaran S, Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Alteration of DMBA-induced oxidative stress by additive action of a modified indigenous preparation~ Kalpaamruthaa. *Chem Biol Interact.* 2007; 167(2):99-106.

Arumugam G, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of gallium nitrate on tamoxifen induced hypercalcemia in rats bearing mammary tumor. *Exp Oncol.* 2006; 28(2):141-145.

B

Bachmeier B, Nerlich AG, Iancu CM, Cilli M, Schleicher E, Vené R, Dell'Eva R, Jochum M, Albini A, Pfeffer U. The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cell Physiol Biochem.* 2007; 19(1-4):137-152.

Bai C, Yan X, Takenaga M, Sekiya K, Nagata T. Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by CG-MS. *J Agric Food Chem.* 1998; 46:3998-4001.

Ballesta MC, Mañas M, Mataix FJ, Martínez-Victoria E, Seiquer I. Long-term adaptation of pancreatic response by dogs to dietary fats of different degrees of saturation: olive and sunflower oil. *Br J Nutr.* 1990; 64(2):487-496.

Ballesta MC, Martinez-Victoria E, Mañas M, Mataix FJ, Seiquer I, Huertas JH. Protein digestibility in dog. Effect of the quantity and quality of dietary fat (virgin olive oil and sunflower oil). *Nahrung.* 1991; 35(2):161-167.

Baraldi PG, Simoni D, Manfredini S, Menziani E. Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol: a reinvestigation. *Liebigs Ann Chem.* 1983; 684-686.

Barbash O, Lin DI, Diehl JA. SCF Fbx4/alphaB-crystallin cyclin D1 ubiquitin ligase: a license to destroy. *Cell Div.* 2007; 2:2.

Battino M, Leone L, Bompadre S. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q₉, coenzyme Q₉H₂, coenzyme Q₁₀, coenzyme Q₁₀H₂, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction. *Methods Enzymol.* 2004; 378:156-162. Review.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature.* 2005; 437(7055):45-46.

- Becker M, Sommer A, Krätzschar JR, Seidel H, Pohlenz HD, Fichtner I. Distinct gene expression patterns in a tamoxifen-sensitive human mammary carcinoma xenograft and its tamoxifen-resistant subline MaCa 3366/TAM. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(1):151-168.
- Bedard PL, Freedman OC, Howell A, Clemons M. Overcoming endocrine resistance in breast cancer: are signal transduction inhibitors the answer?. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 108(3):307-317. Review.
- Ben-Hur H, Kossoy G, Tendler Y, Kossoy N, Zusman I. Effects of cyclophosphamide and soluble tumor-associated antigens on lymphoid infiltration, proliferative activity and rate of apoptosis in chemically-induced rat mammary tumors. *In Vivo.* 2002; 16(5):287-292.
- Bernini LF, Hartevelde CL. Alpha-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1998; 11(1):53-90. Review.
- Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23(1):15-25.
- Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, Oliva-Lauraire MC, Giuliani I, Marty-Double C, Burdy JY, Fabbro-Peray P, Laprade M, Bali JP, Granier C, de la Coussaye JE, Dauzat M. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta.* 2003; 329(1-2):39-51.
- Bingham SA, Luben R, Welch A, Wareman N, Khaw KT, Day N. Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer. *Lancet.* 2003; 362:212-214.
- Binukumar B, Mathew A. Dietary fat and risk of breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2005; 3:45-52.
- Bishop DF. Two different genes encode delta-aminolevulinate synthase in humans: nucleotide sequences of cDNAs for the housekeeping and erythroid genes. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(23):7187-7188.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51(8):971-974.
- Blackshear PE. Genetically engineered rodent models of mammary gland carcinogenesis: an overview. *Toxicol Pathol.* 2001; 29(1):105-116. Review.
-

- Blomen VA, Boonstra J. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(23):3084-3104. Review.
- Bonanome A, Pagnan A, Caruso D, Toia A, Xamin A, Fedeli E, Berra B, Zamburlini A, Ursini F, Galli G. Evidence of postprandial absorption of olive oil phenols in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2000; 10(3):111-120.
- Botti C, Buglioni S, Benevolo M, Giannarelli D, Papaldo P, Cognetti F, Vici P, Di Filippo F, Del Nonno F, Venanzi FM, Natali PG, Mottolese M. Altered expression of FAS system is related to adverse clinical outcome in stage I-II breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(4):1360-1365.
- Bouhgey JC, Buzdar AU, Hunt KK. Recent advances in the hormonal treatment of breast cancer. *Curr Probl Surg.* 2008; 45(1):13-55. Review.
- Boutros R, Ducommun B. Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle.* 2008; 7(3):401-406.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res.* 2007; 67(24):11557-11564.
- Bovicelli P. Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59(12):1703-1710. Review.
- Brea-Calvo G, Rodríguez-Hernández A, Fernández-Ayala DJ, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(8):1293-1302.
- Brecht K, Simonen M, Heim J. Upregulation of alpha globin promotes apoptotic cell death in the hematopoietic cell line FL5.12. *Apoptosis.* 2005a; 10(5):1043-1062.
- Brecht K, Simonen M, Kamke M, Heim J. Hematopoietic transcription factor GATA-2 promotes upregulation of alpha globin and cell death in FL5.12 cells. *Apoptosis.* 2005b; 10(5):1063-1078.
- Brenes M, García A, García P, Garrido A. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(11):5178-5183.
- Brennan PA, Jing J, Ethunandan M, Górecki D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2004; 30(6):589-592. Review.
-

- Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F, Nucci R. Olea europaea L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(17):4934-4940.
- Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001; 3(5):323-327.
- Buffin-Meyer B, Crassous PA, Delage C, Denis C, Schaak S, Paris H. EGF receptor transactivation and PI3-kinase mediate stimulation of ERK by alpha(2A)-adrenoreceptor in intestinal epithelial cells: a role in wound healing. *Eur J Pharmacol.* 2007; 574(2-3):85-93.
- Byrne C, Rockett H, Holmes MD. Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer risk: lack of an association among postmenopausal women with no history of being breast disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11:261-265.

C

- Cabanes A, Wang M, Olivo S, DeAssis S, Gustafsson JA, Khan G, Hilakivi-Clarke L. Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 2004; 25(5):741-748.
- Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2006; 97(2):261-274. Review.
- Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 2008; 124(1):31-42.
- Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C, De Caterina R. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(4):H2344-H2354.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(4):622-629.
-

- Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM. Serum oxytocinase activity is related to tumor growth parameters in N-methyl nitrosourea induced rat breast cancer. *Life Sci.* 2004; 75(11):1369-1377.
- Casey PM, Cerhan JR, Pruthi S. Oral contraceptive use and risk of breast cancer. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(1):86-90. Review.
- Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev.* 2007; 217:141-154. Review.
- Cavalieri EL, Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol Ther.* 1992; 55(2):183-199. Review.
- Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, De Castro J, Espinosa E, Redondo A, Sereno M, García-Cabezas MA, Vara JA, Domínguez-Cáceres A, Perona R, González-Barón M. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control.* 2004; 15(7):707-719. Review.
- Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood.* 2007; 110(6):1748-1755.
- Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL. Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis.* 2005; 26(8):1343-1353.
- Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL. Serial transplantation of NMU-induced rat mammary tumors: a model of human breast cancer progression. *Int J Cancer.* 2007; 121(3):474-485.
- Chang JG, Tsai WC, Chong IW, Chang CS, Lin CC, Liu TC. {beta}-thalassemia major evolution from {beta}-thalassemia minor is associated with paternal uniparental isodisomy of chromosome 11p15. *Haematologica.* 2008; 93(6):913-916.
- Chang KC, Yang JJ, Liao JF, Wang CH, Chiu TH, Hsu FC. Chronic hypobaric hypoxia induces tolerance to acute hypoxia and up-regulation in alpha-2 adrenoceptor in rat locus coeruleus. *Brain Res.* 2006; 1106(1):82-90.
-

- Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, St Clair DK. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv.* 2007; 7(3):147-156. Review.
- Chen-Goodspeed M, Lee CC. Tumor suppression and circadian function. *J Biol Rhythms.* 2007; 22(4):291-298. Review.
- Chiesa IJ, Castillo LF, Lüthy IA. Contribution of alpha(2)-adrenoceptors to the mitogenic effect of catecholestrogen in human breast cancer MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 110(1-2):170-175.
- Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature.* 2008; 452(7187):553-563.
- Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:1079-1085.
- Choi EJ. Antioxidative effects of hesperetin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in mice. *Life Sci.* 2008; 82(21-22):1059-1064.
- Christian MS, Sharper VA, Hoberman AM, Seng JE, Fu L, Covell D, Diener RM, Bitler CM, Crea R. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem Toxicol.* 2004; 27(4):309-330.
- Christov K, Ikui A, Shilkaitis A, Green A, Yao R, You M, Grubbs C, Steele V, Lubet R, Weinstein IB. Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2003a; 77(3):253-264.
- Christov KT, Shilkaitis AL, Kim ES, Steele VE, Lubet RA. Chemopreventive agents induce a senescence-like phenotype in rat mammary tumours. *Eur J Cancer.* 2003b; 39(2):230-239.
- Clarke R. Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. *Breast Cancer Res Treat.* 1997a; 46:117-133.
- Clarke R. Issues in experimental design and endpoints analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models. *Breast Cancer Res Treat.* 1997b; 46:255-278.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to ADN: do we have a reliable biomarker?. *Environ Health Perspect.* 1996; 104 (Suppl 3):S465-S469.
-

- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26:249-261.
- Collins LC, Baer HJ, Tamimi RM, Connolly JL, Colditz GA, Schnitt SJ. Magnitude and laterality of breast cancer risk according to histologic type of atypical hyperplasia: results from the Nurses' Health Study. *Cancer*. 2007; 109(2):180-187.
- Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer*. 2000; 37(1):1-18. Review.
- Coogan PF, Strom BL, Rosenberg L. SSRI use and breast cancer risk by hormone receptor status. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 109(3):527-531.
- Cornwell DG, Ma J. Nutritional Benefit of Olive Oil: The Biological Effects of Hydroxytyrosol and Its Arylating Quinone Adducts. *J Agric Food Chem*. 2008. 56(19):8774-8786.
- Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessì MA, Spencer JP. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 362(3):606-611.
- Corona G, Tzounis X, Assunta Dessì M, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JP. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic Res*. 2006; 40(6):647-658.
- Costa I, Moral R, Solanas M, Escrich E. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 86:225-235.
- Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2002; 126(8):915-927.
- Covas MI, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, López-Sabater C, Pujadas-Bastardes MA, Joglar J, Weinbrenner T, Lamuela-Raventós RM, de la Torre R. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated
-

by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med.* 2006a; 40(4):608-616.

Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, de la Torre R, Kafatos A, Lamuela-Reventós RM, Osada J, Owen RW, Visioli F. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews.* 2006b; 64(10):S20-S30. Review.

D

Danelisen I, Palace V, Lou H, Singal PK. Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34(7):789-795.

D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella L, Tufano MA, Zappia M, Galletti P. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(7):908-919.

D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(11):1492-1498.

De la Puerta R, Martínez-Domínguez E, Ruiz-Gutiérrez V. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z Naturforsch C.* 2000; 55(9-10):814-819.

De la Puerta R, Ruiz-Gutierrez V, Hault JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(4):445-449.

Deberardinis RJ, Lum JJ, Thompson CB. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *J Biol Chem.* 2006; 281(49):37372-37380.

Deepa PR, Varalakshmi P. Beneficial cardio-renal effects of a low-molecular-weight heparin-derivative on adriamycin-induced glycosaminoglycanuria and tissue lipid abnormalities. *Toxicology.* 2005; 211(1-2):77-85.

Degner SC, Kemp MQ, Bowden GT, Romagnolo DF. Conjugated linoleic acid attenuates cyclooxygenase-2 transcriptional activity via an anti-AP-1 mechanism in MCF-7 breast cancer cells. *J Nutr.* 2006; 136(2):421-427.

- Della Ragione F, Cucciolla V, Borriello A, Della Pietra V, Manna C, Galletti P, Zappia V. Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 268(3):942-946.
- Della Ragione F, Cucciolla V, Criniti V, Indaco S, Borriello A, Zappia V. Antioxidants induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Lett.* 2002; 532(3):289-294.
- Della Torre P, Imondi AR, Bernardi C, Podesta A, Moneta D, Riflettuto M, Mazue G. Cardioprotection by dexrazoxane in rats treated with doxorubicin and paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999a; 44(2):138-142.
- Della Torre P, Mazué G, Podestá A, Moneta D, Sammartini U, Imondi AR. Protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in weanling rats by dexrazoxane. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999b; 43:151-156.
- Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L, Galli GV, Bosisio E, Crestani M, De Fabiani E, Tremoli E, Caruso D. Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(9):3259-3264.
- Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Caruso D, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *Br J Nutr.* 2008; 99(5):945-951.
- Dhot PS, Sharma MC, Kumar L, Saxena R. Chemotherapy induced refractory anaemia with ring sideroblasts in carcinoma breast. *J Assoc Physicians India.* 1994; 42(2):153-154.
- Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, Matarrese P, D'Archivio M, Masella R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007; 17(7):535-545.
- Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Müllberg J, Stoyan T, Yasukawa K, Heinrich PC, Graeve L. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269(29):19014-19020.
-

- Do MH, Lee SS, Jung PJ, Lee MH. Intake of dietary fat and vitamin in correlation to breast cancer risk in Korean women: a case control study. *J Korean Med Sci.* 2003; 18:534-540.
- Dolt KS, Karar J, Mishra MK, Salim J, Kumar R, Grover SK, Qadar Pasha MA. Transcriptional downregulation of sterol metabolism genes in murine liver exposed to acute hypobaric hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354(1):148-153.
- Doody MM, Freedman DM, Alexander BH, Hauptmann M, Miller JS, Rao RS, Mabuchi K, Ron E, Sigurdson AJ, Linet MS. Breast cancer incidence in U.S. radiologic technologists. *Cancer.* 2006; 106(12):2707-2715.
- Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2004; 215(2):129-140. Review.
- Douziech M, Sahmi M, Laberge G, Therrien M. A KSR/CNK complex mediated by HYP, a novel SAM domain-containing protein, regulates RAS-dependent RAF activation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2006; 20(7):807-819.
- Drake JM, Friis RR, Dharmarajan AM. The role of sFRP4, a secreted frizzled-related protein, in ovulation. *Apoptosis.* 2003; 8(4):389-397.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47-95. Review.
- Dulyaninova NG, House RP, Betapudi V, Bresnick AR. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(8):3144-3155.
- Duncan AM. The role of nutrition in the prevention of breast cancer. *AACN Clinical Issues.* 2004; 15:119-135.
- Duthie SJ. The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measured using alkaline single cell gel electrophoresis. En: Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in biological sciences, diagnostics and intervention (Richard G Cutler & Henry Rodríguez) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 309-323pp, Singapore, 2003.
-

E

- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365(9472):1687-1717.
- Edwards DJ, Rizk M. Conversion of 3, 4-dihydroxyphenylalanine and deuterated 3, 4-dihydroxyphenylalanine to alcoholic metabolites of catecholamines in rat brain. *J Neurochem*. 1981; 36(5):1641-1647.
- El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res*. 2004; 551(1-2):181-197. Review.
- Eliassen AH, Hankinson SE. Endogenous hormone levels and risk of breast, endometrial and ovarian cancers: prospective studies. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 630:148-165. Review.
- Ely S, Vioral AN. Breast cancer overview. *Plast Surg Nurs*. 2007; 27(3):128-133. Review.
- Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Joseph J, Zaenker KS. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol*. 2004; 5(4):254-258. Review.
- Escrich E, Moral R, García G, Costa I, Sánchez JA. Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 2004; 40:73-78.
- Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51(10):1279-1292. Review.
- Escrich E, Solanas M, Moral R. Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 317-374pp, Oxford, U.K, 2006.
- Escrich E, Solanas M, Soler M, Ruiz De Villa MC, Sánchez JA, Segura R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J Nutr Biochem*. 2001; 12:536-549.
- 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.
-

Even-Ram S, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein RS, Yamada KM. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(3):299-309.

F

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev.* 2002; 11(4):351-358.

Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di Saverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr.* 2006; 136(3):614-619.

Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells. *J Nutr.* 2008a; 138(1):42-48.

Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr.* 2008b; 138(8):1411-1416.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005; 434(7035):917-921.

Fedrowitz M, Westermann J, Loscher W. Magnetic field exposure increases cell proliferation but does not affect melatonin levels in the mammary gland of female Sprague Dawley rats. *Cancer Res.* 2002; 62(5):1356-1363.

Fenton RG, Longo DL. Biología de la célula cancerosa y angiogénesis. En: HarrisonOnLine. Principios de medicina interna (Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher) McGraw Hill-Interamericana Editores, España, Cap. 68, Ed. 16ª, 2006. (www.harrisonmedicina.com).

- Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J Agric Food Chem.* 2002; 50(23):6804-6811.
- Fki I, Sahnoun Z, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(3):624-631.
- Forget BG. De novo and acquired forms of alpha thalassemia. *Curr Hematol Rep.* 2006; 5(1):11-14. Review.
- Forman MR, Hursting SD, Umar A, Barrett JC. Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24:223-254. Review.
- Forssén UM, Rutqvist LE, Ahlbom A, Feychting M. Occupational magnetic fields and female breast cancer: a case-control study using Swedish population registers and new exposure data. *Am J Epidemiol.* 2005; 161(3):250-259.
- Fu L, Pellicano H, Liu J, Hang P, Lee CC. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumour suppression and DNA damage response in vivo. *Cell.* 2002; 111:41-50.
- Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12):4892-4894.

G

- Garcia J, Ye Y, Arranz V, Letourneux C, Pezeron G, Porteu F. IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation. *EMBO J.* 2002; 21(19):5151-5163.
- GLOBOCAN 2002. Ferlay J, Bray F, Parkin DM. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase N° 5, version 2.0. Lyon, France: IARC Press 2004.
- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br J Nutr.* 2008a Sep 8:1-8. (Epub ahead of print).
-

- González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem.* 2008b; 56(17):7872-7876.
- González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, Gil-Loyzaga P, López-Huertas E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis.* 2006; 188(1):35-42.
- González-Santiago M. Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos animales y humanos. Ed. Universidad de Granada. 2005. ISBN: 84-338-3409-6.
- Gounelle H, Fontan P, Demarne M. Olive oil and blood cholesterol levels. *Am J Clin Nutr.* 1962; 10:119-123.
- Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr.* 2007; 46(2):70-78.
- Granados S, Quiles JL, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. Dietary lipids and cancer. *Nutr Hosp.* 2006; 21(Suppl 2):S42-S52, 44-54. Review.
- Grasso S, Siracusa L, Spatafora C, Renis M, Tringali C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg Chem.* 2007; 35(2):137-152.
- Gruvberger-Saal SK, Parsons R. Is the small heat shock protein alphaB-crystallin an oncogene?. *J Clin Invest.* 2006; 116(1):30-32.
- Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, Daniel F, Grodet A, Gougerot-Pocidallo MA, Chastre E, Kotelevets L, Lizard G, Vandewalle A, Driss F, Ogier-Denis E. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2006; 27(9):1812-1827.
- Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 54(2):401-414.
-

- Gupta PB, Kuperwasser C. Contributions of estrogen to ER-negative breast tumor growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 102(1-5):71-78. Review.
- Gurzov EN, Bakiri L, Alfaro JM, Wagner EF, Izquierdo M. Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy. *Oncogene.* 2008; 27(5):641-652.
- Gutzman JH, Rugowski DE, Schroeder MD, Watters JJ, Schuler LA. Multiple kinase cascades mediate prolactin signals to activating protein-1 in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2004; 18(12):3064-3075.

H

- Hack AA, Groh ME, McNally EM. Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech.* 2000; 48(3-4):167-180. Review.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Third Edition. Oxford Science Publications. New York, 1999.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007a; 35(Pt 5):1147-1150. Review.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet.* 1994; 344(8924):721-724. Review.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochem J.* 2007b; 401(1):1-11. Review.
- Hamelin V, Letourneux C, Romeo PH, Porteu F, Gaudry M. Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood.* 2006; 107(8):3106-3113.
- Han X, Pan J, Ren D, Cheng Y, Fan P, Lou H. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(9):3140-3146.
- Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomed Pharmacother.* 2008; 62(2):104-109.
- Hartmann A, Aguerri E, Beepers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 2003; 18(1):45-51.
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Johnson J, Blake C, Tlsty T,

- Vachon CM, Melton LJ 3rd, Visscher DW. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(3):229-237.
- Hashim YZ, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, Kaisalo L, Wähälä K, Gill CI. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int J Cancer.* 2008; 122(3):495-500.
- Hayashi S, Yamaguchi Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 109(3-5):201-206.
- He B, Lee AY, Dadfarmay S, You L, Xu Z, Reguart N, Mazieres J, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res.* 2005; 65(3):743-748.
- He L, Fan C, Ning X, Feng X, Liu Y, Chen B, Tang D. Interaction of p14(ARF) with Brca1 in cancer cell lines and primary breast cancer. *Cell Biol Int.* 2008; 32(10):1302-1309.
- Heydemann A, McNally EM. Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy. *Trends Cardiovasc Med.* 2007; 17(2):55-59. Review.
- Higashi M, Tajiri T, Kinoshita Y, Tatsuta K, Souzaki R, Maehara Y, Suita S, Taguchi T. High expressions of neuronatin isoforms in favorable neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007; 29(8):551-556.
- Hoffman-Goetz L. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(11):1828-1833.
- Holub MC, Hegyesi H, Igaz P, Polgár A, Toth S, Falus A. Soluble interleukin-6 receptor enhanced by oncostatin M induces major changes in gene expression profile of human hepatoma cells. *Immunol Lett.* 2002; 82(1-2):79-84.
- Hooker CW, Hurlin PJ. Of Myc and Mnt. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 2):208-216. Review.
- Hornstra G, Lussenburg RN. Relationship between the type of dietary fatty acid and arterial thrombosis tendency in rats. *Atherosclerosis.* 1975; 22(3):499-516.
- Horvath LG, Lelliott JE, Kench JG, Lee CS, Williams ED, Saunders DN, Grygiel JJ, Sutherland RL, Henshall SM. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits
-

- proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *Prostate*. 2007; 67(10):1081-1090.
- Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007; 9(4):210-219. Review.
- Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Critical significance of breast structure in the induction of mammary cancer in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1959; 45:1294-1300.
- Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature*. 1961; 189:204-207.
- Hwang ES, Bowen PE. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007; 47(1):27-50. Review.

I

- Ichikawa Y, Hirokawa M, Aiba N, Fujishima N, Komatsuda A, Saitoh H, Kume M, Miura I, Sawada K. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-resistant K562 human leukemia cells by serial analysis of gene expression. *Int J Hematol*. 2004; 79(3):276-282.
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*. 2003; 10(23):2495-2505. Review.
- Inukai T, Inaba T, Dang J, Kuribara R, Ozawa K, Miyajima A, Wu W, Look AT, Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K, Kagami K, Goi K, Sugita K, Nakazawa S. TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common beta chain of cytokine receptors. *Blood*. 2005; 105(11):4437-4444.
- Iovannisci DM, Lammer EJ, Steiner L, Cheng S, Mahoney LT, Davis PH, Lauer RM, Burns TL. Association between a leukotriene C4 synthase gene promoter polymorphism and coronary artery calcium in young women: the Muscatine Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(2):394-399.
- Isogai M, Kondo K, Kitamura N. Change in chemosensitivity of DMBA-induced rat mammary tumor after oophorectomy. *Anticancer Res*. 1998; 18(2A):963-966.
-

Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kuma K, Miyauchi A. Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma. *Breast Cancer*. 2004; 11(3):295-300.

J

Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interact*. 2008a Sep 7. (Epub ahead of print).

Jemai H, Fki I, Bouaziz M, Bouallagui Z, El Feki A, Isoda H, Sayadi S. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem*. 2008b; 56(8):2630-2636.

Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005; 4(2):139-163. Review.

Johnson AT, Kaufmann Y, Luo S, Babb K, Hawk R, Klimberg VS. Gut glutathione metabolism and changes with 7,12-DMBA and glutamine. *J Surg Res*. 2003a; 115(2):242-246.

Johnson AT, Kaufmann YC, Luo S, Todorova V, Klimberg VS. Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF-beta 1. *J Surg Res*. 2003b; 111(2):222-228.

Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays*. 2002; 24(9):811-820. Review.

K

Kaklamani VG, Gradishar WJ. Epirubicin versus doxorubicin: which is the anthracycline of choice for the treatment of breast cancer?. *Clin Breast Cancer*. 2003; 4 (Suppl 1):S26-S33. Review.

Kamradt MC, Lu M, Werner ME, Kwan T, Chen F, Strohecker A, Oshita S, Wilkinson JC, Yu C, Oliver PG, Duckett CS, Buchsbaum DJ, LoBuglio AF, Jordan VC, Cryns VL. The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *J Biol Chem*. 2005; 280(12):11059-11066.

- Kapoor R, Huang YS. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006; 7(6):531-534. Review.
- Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology.* 2004; 36(2):120-128. Review.
- Karkoulis G, Mastrogianni O, Lymperopoulos A, Paris H, Flordellis C. alpha(2)-Adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR. *Cell Signal.* 2006; 18(5):729-739.
- Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61(Suppl 6):1368S-1373S. Review.
- Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr.* 1994; 60(Suppl 6):1017S-1022S. Review.
- Kaufmann Y, Kornbluth J, Feng Z, Fahr M, Schaefer RF, Klimberg VS. Effect of glutamine on the initiation and promotion phases of DMBA-induced mammary tumor development. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2003; 27(6):411-418.
- Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(4):513-519. Review.
- Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 13):2627-2634. Review.
- Kelley NS, Hubbard NE, Erickson KL. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J Nutr.* 2007; 137(12):2599-2607. Review.
- Key TJ, Spencer EA. Carbohydrates and cancer: an overview of the epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61 (Suppl 1):S112-S121. Review.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1986; 124(6):903-915.
- Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation.* 1970; 41:1-211.
- Keys A. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Harvard University press. Cambridge, 1980.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(3):475-510. Review.
-

- Kimbrow KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13:739-749
- Kinlaw WB, Quinn JL, Wells WA, Roser-Jones C, Moncur JT. Spot 14: A marker of aggressive breast cancer and a potential therapeutic target. *Endocrinology*. 2006; 147(9):4048-4055. Review.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004; 44:239-267. Review.
- Kleiner HE, Vulimiri SV, Hatten WB, Reed MJ, Nebert DW, Jefcoate CR, DiGiovanni J. Role of cytochrome p450 family members in the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mouse epidermis. *Chem Res Toxicol*. 2004; 17(12):1667-1674.
- Kon SK, Booth RG. The vitamin D activity of butter: An attempt to elucidate the nature of the labile factor in butter antirachitic for the rat. The antirachitic potency of lard, olive oil, egg oil and the fatty acids of butters and lard. *Biochem J*. 1934; 28(1):121-130.
- Kris-Etherton PM. AHA science advisory: monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *J Nutr*. 1999; 129(12):2280-2284. Review.
- Kubatka P, Ahlersová E, Ahlers I, Bojková B, Kalická K, Adámeková E, Marková M, Chamilová M, Čermáková M. Variability of mammary carcinogenesis induction in female Sprague-Dawley and Wistar:Han rats: the effects of season and age. *Physiol Res*. 2002; 51:633-640.
- Kuerbitz SJ, Pahys J, Wilson A, Compitello N, Gray TA. Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia. *Carcinogenesis*. 2002; 23(4):559-564.
- Kumaraguruparan R, Seshagiri PB, Hara Y, Nagini S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by black tea polyphenols: modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Mol Carcinog*. 2007; 46(9):797-806.
- Kuramoto T, Morimura K, Yamashita S, Okochi E, Watanabe N, Ohta T, Ohki M, Fukushima S, Sugimura T, Ushijima T. Etiology-specific gene expression profiles in rat mammary carcinomas. *Cancer Res*. 2002; 62(13):3592-3597.
- Kushi L, Giovannucci E. Dietary fat and cancer. *Am J Med*. 2002; 113:63S-70S.
-

Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong AN. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(9):1409-1421.

L

Lacher MD, Siegenthaler A, Jäger R, Yan X, Hett S, Xuan L, Saurer S, Lareu RR, Dharmarajan AM, Friis R. Role of DDC4/sFRP-4, a secreted frizzled-related protein, at the onset of apoptosis in mammary involution. *Cell Death Differ.* 2003; 10(5):528-538.

Lash TL, Pedersen L, Cronin-Fenton D, Ahern TP, Rosenberg CL, Lunetta KL, Silliman RA, Hamilton-Dutoit S, Garne JP, Ewertz M, Sørensen HT. Tamoxifen's protection against breast cancer recurrence is not reduced by concurrent use of the SSRI citalopram. *Br J Cancer.* 2008; 99(4):616-621.

Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Lévy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B, Batteux F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2005; 65(3):948-956.

Lee PL, Barton JC, Rao SV, Acton RT, Adler BK, Beutler E. Three kinships with ALAS2 P520L (c. 1559 C → T) mutation, two in association with severe iron overload, and one with sideroblastic anemia and severe iron overload. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36(2):292-297.

Lee R, Woo W, Wu B, Kummer A, Duminy H, Xu Z. Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003; 228(6):689-696.

Lee WM, Lu S, Medline A, Archer MC. Susceptibility of lean and obese Zucker rats to tumorigenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett.* 2001; 162(2):155-160.

Leenen R, Roodenburg AJ, Vissers MN, Schuurbijs JA, van Putte KP, Wiseman SA, van de Put FH. Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: influence on LDL oxidation. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(5):1290-1297.

- Li HL, Wang TS, Li XY, Li N, Huang DZ, Chen Q, Ba Y. Overexpression of cyclin L2 induces apoptosis and cell-cycle arrest in human lung cancer cells. *Chin Med J (Engl)*. 2007; 120(10):905-909.
- Li X, Niu T, Manley JL. The RNA binding protein RNPS1 alleviates ASF/SF2 depletion-induced genomic instability. *RNA*. 2007; 13(12):2108-2115.
- Li Y, Huang J, Zhao YL, He J, Wang W, Davies KE, Nosé V, Xiao S. UTRN on chromosome 6q24 is mutated in multiple tumors. *Oncogene*. 2007; 26(42):6220-6228.
- Licht AH, Pein OT, Florin L, Hartenstein B, Reuter H, Arnold B, Lichter P, Angel P, Schorpp-Kistner M. JunB is required for endothelial cell morphogenesis by regulating core-binding factor beta. *J Cell Biol*. 2006; 175(6):981-991.
- Lim JH, Lee ES, You HJ, Lee JW, Park JW, Chun YS. Ras-dependent induction of HIF-1alpha785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion. *Oncogene*. 2004; 23(58):9427-9431.
- Lin DI, Barbash O, Kumar KG, Weber JD, Harper JW, Klein-Szanto AJ, Rustgi A, Fuchs SY, Diehl JA. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. *Mol Cell*. 2006; 24(3):355-366.
- Lin DI, Lessie MD, Gladden AB, Bassing CH, Wagner KU, Diehl JA. Disruption of cyclin D1 nuclear export and proteolysis accelerates mammary carcinogenesis. *Oncogene*. 2008; 27(9):1231-1242.
- Ling MT, Wang X, Zhang X, Wong YC. The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation*. 2006; 74(9-10):481-487. Review.
- Linos E, Willett WC. Diet and breast cancer risk reduction. *J Natl Compr Canc Netw*. 2007; 5(8):711-718. Review.
- Liska J, Galbavy S, Macejova D, Zlatos J, Brtko J. Histopathology of mammary tumours in female rats treated with 1-methyl-1-nitrosourea. *Endocr Regul*. 2000; 34(2):91-96.
- Liu D, Evans I, Britton G, Zachary I. The zinc-finger transcription factor, early growth response 3, mediates VEGF-induced angiogenesis. *Oncogene*. 2008; 27(21):2989-2998.
- Liu J, Kraut EH, Balcerzak S, Grever M, D'Ambrosio S, Chan KK. Dosing sequence-dependent pharmacokinetic interaction of oxaliplatin with paclitaxel in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002; 50: 445-453.
-

Llor X, Cabré E, Gassul MA. The effect of olive oil on inflammatory bowel disease. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 309-316pp, Oxford, U.K 2006.

M

Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res.* 2006; 8(4):R43.

Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2007; 10(1-2):13-29. Review.

Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005; 371(6):457-465.

Malejka-Giganti D, Parkin DR, Bennett KK, Lu Y, Decker RW, Niehans GA, Bliss RL. Suppression of mammary gland carcinogenesis by post-initiation treatment of rats with tamoxifen or indole-3-carbinol or their combination. *Eur J Cancer Prev.* 2007; 16(2):130-141.

Mañas M, Yago MD, Martínez-Victoria E. Olive oil regulation of gastrointestinal function. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 284-308pp, Oxford, U.K 2006.

Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D'Angelo S, Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 2000; 470(3):341-344.

Mansilla S, Rojas M, Bataller M, Priebe W, Portugal J. Circumvention of the multidrug-resistance protein (MRP-1) by an antitumor drug through specific inhibition of gene transcription in breast tumor cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(7):934-942.

Mao YW, Liu JP, Xiang H, Li DW. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004; 11(5):512-526.

- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 2003; 83(2):337-376. Review.
- Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, Miró-Casas E, Gimeno E, López-Sabater MC, de la Torre R, Farré M, SOLOS Investigators. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation—a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004; 43(3):140-147.
- Martel PM, Bingham CM, McGraw CJ, Baker CL, Morganelli PM, Meng ML, Armstrong JM, Moncur JT, Kinlaw WB. S14 protein in breast cancer cells: direct evidence of regulation by SREBP-1c, superinduction with progestin, and effects on cell growth. *Exp Cell Res.* 2006; 312(3):278-288.
- Martin LJ, Boyd NF. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(1):201-215. Review.
- Martínez-González J, Rodríguez-Rodríguez R, González-Díez M, Rodríguez C, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V, Badimon L. Oleonic acid induces prostacyclin release in human vascular smooth muscle cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *J Nutr.* 2008; 138(3):443-448.
- Marxfeld H, Grenet O, Bringel J, Staedtler F, Harleman JH. Differentiation of spontaneous and induced mammary adenocarcinomas of the rat by gene expression profiling. *Exp Toxicol Pathol.* 2006a; 58(2-3):151-161.
- Marxfeld H, Staedtler F, Harleman JH. Characterisation of two rat mammary tumour models for breast cancer research by gene expression profiling. *Exp Toxicol Pathol.* 2006b; 58(2-3):133-143.
- Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R. Epidemiology of olive oil and cardiovascular disease. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 152-171pp, Oxford, U.K 2006.
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(4):511-521.
- Mathivadhani P, Shanthi P, Sachdanandam P. Hypoxia and its downstream targets in DMBA induced mammary carcinoma: protective role of Semecarpus anacardium nut extract. *Chem Biol Interact.* 2007; 167(1):31-40.
-

- Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T. Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay?. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1999; 45(6):751-762. Review.
- Mazaki Y, Hashimoto S, Tsujimura T, Morishige M, Hashimoto A, Aritake K, Yamada A, Nam JM, Kiyonari H, Nakao K, Sabe H. Neutrophil direction sensing and superoxide production linked by the GTPase-activating protein GIT2. *Nat Immunol*. 2006; 7(7):724-731.
- McLoughlin DM, Miller CC. The FE65 proteins and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2008; 86(4):744-754. Review.
- Medina D. Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands. *Breast Dis*. 2007; 28:63-68. Review.
- Medina E, Brenes M, Romero C, García A, de Castro A. Main antimicrobial compounds in table olives. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(24):9817-9823.
- Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(14):4954-4961.
- Meeran SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci*. 2008; 13:2191-2202. Review.
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Prévaille X, Arrigo AP. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J*. 1996a; 15(11):2695-2706.
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*. 1996b; 271(28):16510-16514.
- Mehta RG. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36(10):1275-1282. Review.
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM. Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem Res Toxicol*. 2000; 13(1):10-17.
-

- Menendez JA, del Mar Barbacid M, Montero S, Sevilla E, Escrich E, Solanas M, Cortés-Funes H, Colomer R. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *Eur J Cancer*. 2001; 37(3):402-413.
- Menendez JA, Papadimitropoulou A, Vellon L, Lupu R. A genomic explanation connecting "Mediterranean diet", olive oil and cancer: oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory "PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site" complexes at the Her-2/neu (erbB-2) oncogene promoter in breast, ovarian and stomach cancer cells. *Eur J Cancer*. 2006; 42(15):2425-2432.
- Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2007; 7:80-99.
- Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *Int J Mol Med*. 2008; 22(4):433-439.
- Menendez JA, Vellon L, Colomer R, Lupu R. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann Oncol*. 2005; 16:359-371.
- Meredith EJ, Holder MJ, Chamba A, Challa A, Drake-Lee A, Bunce CM, Drayson MT, Pilkington G, Blakely RD, Dyer MJ, Barnes NM, Gordon J. The serotonin transporter (SLC6A4) is present in B-cell clones of diverse malignant origin: probing a potential anti-tumor target for psychotropics. *FASEB J*. 2005; 19(9):1187-1189.
- Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer*. 2007; 109(Suppl 12):S2712-S2749. Review.
- Milde-Langosch K, Bamberger AM, Methner C, Rieck G, Löning T. Expression of cell cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and

- cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members. *Int J Cancer*. 2000; 87(4):468-472.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8:95-108.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta nacional de salud de España 1987-1997. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Gobierno de España, 1989-1999.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. La Situación del Cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Gobierno de España, 2005.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(2):185-229. Review.
- Miranda JL, Molina AB, Perez-Jimenez F. Olive oil and haemostasis. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 223-239pp, Oxford, U.K 2006.
- Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, Roset P, de la Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem*. 2003; 49(6 Pt 1):945-952.
- Miro-Casas E, Farré Albaladejo M, Covas MI, Rodríguez JO, Menoyo Colomer E, Lamuela Raventós RM, de la Torre R. Capillary gas chromatography-mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem*. 2001; 294(1):63-72.
- Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, Boddaert N, Desguerre I, de Lonlay P, de Baulny HO, Munnich A, Rötig A. CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(3):623-630.
- Moncur JT, Park JP, Memoli VA, Mohandas TK, Kinlaw WB. The "Spot 14" gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: implications for control of tumor metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(12):6989-6994.
- Moral R, Solanas M, García G, Colomer R, ESCRICH E. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high fat in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep*. 2003; 10:1417-1424.
-

- Morin PJ, Trent JM, Collins FS, Vogelstein B. Aspectos genéticos del cáncer. En: HarrisonOnLine. Principios de medicina interna (Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher) McGraw Hill-Interamericana Editores, España, Cap. 68, Ed. 16ª, 2006. (www.harrisonmedicina.com).
- Moser M, Schaumberger K, Schernhammer E, Stevens RG. Cancer and rhythm. *Cancer Causes Control*. 2006; 17(4):483-487.
- Moulder S, Hortobagyi GN. Advances in the treatment of breast cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 83(1):26-36. Review.
- Mungenast AE, Ojeda SR. Expression of three gene families encoding cell-cell communication molecules in the prepubertal nonhuman primate hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 2005; 17(4):208-219.
- Murata T, Yamawaki H, Hori M, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. *Br J Pharmacol*. 2001; 132(7):1365-1373.
- Murray SA, Yang S, Demicco E, Ying H, Sherr DH, Hafer LJ, Rogers AE, Sonenshein GE, Xiao ZX. Increased expression of MDM2, cyclin D1, and p27Kip1 in carcinogen-induced rat mammary tumors. *J Cell Biochem*. 2005; 95(5):875-884.

N

- Nacional Toxicology Program. NTP studies of magnetic field promotion (DMBA initiation) in female Sprague-Dawley rats (whole-body exposure/gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 1999; 489:1-148.
- Napal L, Marrero PF, Haro D. An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Mol Biol*. 2005; 354(4):751-759.
- Nausch N, Florin L, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M, Cerwenka A. Cutting edge: the AP-1 subunit JunB determines NK cell-mediated target cell killing by regulation of the NKG2D-ligand RAE-1epsilon. *J Immunol*. 2006; 176(1):7-11.
- Newman LA, Singletary SE. Overview of adjuvant systemic therapy in early stage breast cancer. *Surg Clin North Am*. 2007; 87(2):499-509. Review.
- Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 889:193-203. Review.
-

Nousis L, Doulias PT, Aligiannis N, Bazios D, Agalias A, Galaris D, Mitakou S. DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 2005; 39(7):787-795.

Novikova NA. The effect of oleic acid sodium salt on the course of experimental atherosclerosis in rabbits. *Vopr Pitan.* 1968; 27(4):82-83.

O

Ochoa JJ, Huertas JR, Quiles JL, Olvera AB, Mataix J. Relative importance of the saponified and unsaponified fractions of dietary olive oil on mitochondrial lipid peroxidation in rabbit heart. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 1999; 9(6):284-288.

Ochoa JJ, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Mataix J, Huertas JR. Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in fatty acid composition and peroxidation in rabbit LDL. *Nutrition.* 2002; 18(1):60-65.

Ochoa-Herrera JJ, Huertas JR, Quiles JL, 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 Nutr Biochem.* 2001; 12(6):357-364.

O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidal MA, Pasquier C, El-Benna J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(10):2003-2008.

Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest.* 2004; 51(3-4):146-153. Review.

Okey R, Harris A, Scheier G, Lyman MM, Yett S. Effect of olive oil and squalene on cholesterol mobilization in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1959; 100(1):198-201.

Onda M, Akaishi J, Asaka S, Okamoto J, Miyamoto S, Mizutani K, Yoshida A, Ito K, Emi M. Decreased expression of haemoglobin beta (HBB) gene in anaplastic thyroid cancer and recovery of its expression inhibits cell growth. *Br J Cancer.* 2005; 92(12):2216-2224.

- Opolski A, Mazurkiewicz M, Wietrzyk J, Kleinrok Z, Radzikowski C. The role of GABAergic system in human mammary gland pathology and in growth of transplantable murine mammary cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000; 19(3):383-390.
- Östling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123:291-298.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000; 1:107-112. Review.
- Owen RW, Haubner R, Würtele G, Hull E, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev.* 2004; 13(4):319-326. Review.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007; 96(9):2181-2196. Review.

P

- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massagué J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 2008; 133(1):66-77.
- Palmerini CA, Carlini E, Saccardi C, Servili M, Montedoro G, Arienti G. Activity of olive oil phenols on lymphomonocyte cytosolic calcium. *J Nutr Biochem.* 2005; 16(2):109-113.
- Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, Narula N, Narula J, Jain D. Potentiation of Doxorubicin cardiotoxicity by iron loading in a rodent model. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49(25):2457-2464.
- Papaconstantinou AD, Shanmugam I, Shan L, Schroeder IS, Qiu C, Yu M, Snyderwine EG. Gene expression profiling in the mammary gland of rats treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Int J Cancer.* 2006; 118(1):17-24.
- Park JH, Kaushansky K, Levitt L. Transcriptional regulation of interleukin 3 (IL3) in primary human T lymphocytes. Role of AP-1- and octamer-binding proteins in control of IL3 gene expression. *J Biol Chem.* 1993; 268(9):6299-6308.
- Parkin DM, Fernández LMG. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *The Breast Journal.* 2006; 12 (Suppl.1): S70-S80.
-

- Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12(1):1-18. Review.
- Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio JJ, Garcia Luna PP, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton PM, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez MA, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Perucho M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriguer-Escofet F, de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35(7):421-424. Review.
- Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(10):1199-1208. Review.
- Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. Olive oil, blood lipids and postprandial lipaemia. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 172-193pp, Oxford, U.K 2006.
- Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P. Combined efficacy of tamoxifen and coenzyme Q₁₀ on the status of lipid peroxidation and antioxidants in DMBA induced breast cancer. *Mol Cell Biochem.* 2005; 273(1-2):151-60.
- Petroni A, Blasevich M, Papini N, Salami M, Sala A, Galli C. Inhibition of leukocyte leukotriene B₄ production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thromb Res.* 1997; 87(3):315-322.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res.* 1995; 78(2):151-160.
- Piras G, El Kharroubi A, Kozlov S, Escalante-Alcalde D, Hernandez L, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Stewart CL. Zac1 (Lot1), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes:

- identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(9):3308-3315.
- Pirozzi G, Terry RW, Epstein D, Labow MA. Identification and characterization of a novel surface antigen gene induced in mast cells activated through the high affinity IgE receptor. *J Immunol.* 1995; 155(12):5811-5818.
- Pischon T, Nöthlings U, Boeing H. Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2008; 67(2):128-145. Review.
- Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000; 14(15):1837-1851. Review.
- Pollán M, Ramis R, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez D, Lope V, García-Pérez J, Carrasco JM, García-Mendizábal MJ, López-Abente G. Municipal distribution of breast cancer mortality among women in Spain. *BMC Cancer.* 2007; 7:78.
- Ponder BAJ. Cancer genetics. *Nature.* 2001; 411:336-341.
- Puel C, Mardon J, Agalias A, Davicco MJ, Lebecque P, Mazur A, Horcajada MN, Skaltsounis AL, Coxam V. Major Phenolic Compounds in Olive Oil Modulate Bone Loss in an Ovariectomy/Inflammation Experimental Model. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(20):9417-9422.
- Puertollano MA, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G, de Pablo MA. Significance of olive oil in the host immune resistance to infection. *Br J Nutr.* 2007; 98 (Suppl 1):S54-S58. Review.

Q

- Quiles J L, Ramirez-Tortosa M C, Gomez J A, Huertas J R, Mataix J. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry.* 2002a; 76:461-468.
- Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KW. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr.* 2002b; 88(3):225-234.
- Quiles JL, Huertas J, Wahle KWJ, Battino M, Mataix J. Aceite de oliva y cáncer. En: *Aceite de oliva y salud* (J Mataix). Universidad de Granada y Puleva Food. 155-188pp, Granada, 2001.
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology.* 2002c; 180(1):79-95. Review.

- Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Battino M, Mataix J. Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil. *Br J Nutr.* 1999a; 81(1):21-24.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, López-Frías M, Mataix J. Olive oil and mitochondrial oxidative stress: Studies on adriamycin toxicity, physical exercise and ageing. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 119-151pp, Oxford, U.K, 2006.
- Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Ibáñez S, Alfonso González J, Duthie GG, Huertas JR, Mataix J. Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Radic Res.* 1999b; 31:S129-S135.

R

- Raa A, Stansberg C, Steen VM, Bjerkvig R, Reed RK, Stuhr LE. Hyperoxia retards growth and induces apoptosis and loss of glands and blood vessels in DMBA-induced rat mammary tumors. *BMC Cancer.* 2007; 7:23.
- Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278(3):733-739.
- Ramirez-Tortosa MC, Aguilera CM, Quiles JL, Gil A. Influence of dietary lipids on lipoprotein composition and LDL Cu(2+)-induced oxidation in rabbits with experimental atherosclerosis. *Biofactors.* 1998; 8(1-2):79-85.
- Ramirez-Tortosa MC, Granados S, Quiles JL. Chemical composition, types and characteristics of olive oil. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 45-62pp, Oxford, U.K, 2006.
- Ramirez-Tortosa MC, Suárez A, Gómez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Effect of extra-virgin olive oil and fish-oil supplementation on plasma lipids and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative alteration in free-living spanish male patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr.* 1999a; 18(3):167-174.
- Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, López-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation
-

- more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr.* 1999b; 129(12):2177-2183.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9-10):1231-1237.
- Reang P, Gupta M, Kohli K. Biological response modifiers in cancer. *Med Gen Med.* 2006; 8(4):33. Review.
- Reimer T, Herrnring C, Koczan D, Richter D, Gerber B, Kabelitz D, Friese K, Thiesen HJ. FasL:Fas ratio a prognostic factor in breast carcinomas. *Cancer Res.* 2000; 60(4):822-828.
- Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell.* 2007; 11(2):175-189.
- Révillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonneterre J, Peyrat JP. ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Ann Oncol.* 2008; 19(1):73-80.
- Riddick CA, Serio KJ, Hodulik CR, Ring WL, Regan MS, Bigby TD. TGF-beta increases leukotriene C4 synthase expression in the monocyte-like cell line, THP-1. *J Immunol.* 1999; 162(2):1101-1107.
- Rietjens SJ, Bast A, de Vente J, Haenen GR. The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NObullet response of isolated rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007a; 292(4):H1931-H1936.
- Rietjens SJ, Bast A, Haenen GR. New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem.* 2007b; 55(18):7609-7614.
- Rocher G, Letourneux C, Lenormand P, Porteu F. Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J Biol Chem.* 2007; 282(8):5468-5477.
- Rodriguez-Cruz M, Tovar AR, Palacios-González B, Del Prado M, Torres N. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Delta5
-

- and Delta6 desaturases, SREBP-1, PPARalpha, and PGC-1. *J Lipid Res.* 2006; 47(3):553-560.
- Rosbash M, Takahashi JS. Circadian rhythms: the cancer connection. *Nature.* 2002; 420(6914):373-374.
- Rose DP, Connolly JM, Coleman M. Effect of n-3 fatty acids on the progression of metastases after excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1996; 2:1751-1756.
- Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(5):613-624. Review.
- Roy A, Sen S, Chakraborti AS. In vitro nonenzymatic glycation enhances the role of myoglobin as a source of oxidative stress. *Free Radic Res.* 2004; 38(2):139-146.
- Ruano J, López-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, Fernández J, Caballero J, Covas MI, Jiménez Y, Pérez-Martínez P, Marín C, Fuentes F, Pérez-Jiménez F. Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(2):341-346.
- Ruccia D. Research on the possible presence of vitamin E in olive oil. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1953; 29(4):397-400.
- Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJ, Guerrero A, Cert AM, Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *J Hypertens.* 1996; 14(12):1483-1490.
- Ruscica M, Dozio E, Motta M, Magni P. Role of neuropeptide Y and its receptors in the progression of endocrine-related cancer. *Peptides.* 2007; 28(2):426-434. Review.
- Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect.* 1996; 104(9):938-967. Review.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest.* 1990; 62(3):244-278. Review.
- Russo J, Mailo D, Hu YF, Balogh G, Sheriff F, Russo IH. Breast differentiation and its implication in cancer prevention. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:931S-936S. Review.
- Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000; 5(2):187-200. Review.
-

- Russo J, Russo IH. Role of differentiation in the pathogenesis and prevention of breast cancer. *Endocr Related Cancer*. 1997; 4:7-21.
- Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 102(1-5):89-96. Review.
- Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1982; 2(1):5-73. Review.

S

- Sabe H, Onodera Y, Mazaki Y, Hashimoto S. Arf-GAP family proteins in cell adhesion, migration and tumor invasion. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18(5):558-564.
- Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2008; 34(4):357-364. Review.
- Salami M, Galli C, De Angelis L, Visioli F. Formation of F₂-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacol Res*. 1995; 31(5):275-279.
- Salehi F, Turner MC, Phillips KP, Wigle DT, Krewski D, Aronson KJ. Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2008; 11(3-4):276-300. Review.
- sal-Shabanah O, Mansour M, el-Kashef H, al-Bekairi A. Captopril ameliorates myocardial and hematological toxicities induced by adriamycin. *Biochem Mol Biol Int*. 1998; 45(2):419-427.
- Samuelson E, Nilsson J, Walentinsson A, Szpirer C, Behboudi A. Absence of Ras mutations in rat DMBA-induced mammary tumors. *Mol Carcinog*. 2008 Jul 22. (Epub ahead of print).
- Samy RP, Gopalakrishnakone P, Ignacimuthu S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact*. 2006; 164(1-2):1-14.
- Santos RV, Batista ML Jr, Caperuto EC, Costa Rosa LF. Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after Doxorubicin treatment in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(12):1294-1299.
-

- Sarada S, Himadri P, Mishra C, Geetali P, Ram MS, Ilavazhagan G. Role of Oxidative Stress and NF κ B in Hypoxia-Induced Pulmonary Edema. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233(9):1088-1098.
- Sarkar FH, Li Y. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front Biosci*. 2008; 13:2950-2959. Review.
- Sausville EA, Longo DA. Principios del tratamiento del cáncer: cirugía, quimioterapia y tratamiento biológico. En: HarrisonOnLine. Principios de medicina interna (Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher) McGraw Hill-Interamericana Editores, España, Cap. 70, Ed. 16ª, 2006. (www.harrisonmedicina.com).
- Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid IM, Palmer LJ, Kompauer I, Demmelmair H, Illig T, Koletzko B, Heinrich J. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(11):1745-1756.
- Schmidt D, Textor B, Pein OT, Licht AH, Andrecht S, Sator-Schmitt M, Fusenig NE, Angel P, Schorpp-Kistner M. Critical role for NF-kappaB-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. *EMBO J*. 2007; 26(3):710-719.
- Schmitt CA, Handler N, Heiss EH, Erker T, Dirsch VM. No evidence for modulation of endothelial nitric oxide synthase by the olive oil polyphenol hydroxytyrosol in human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007; 195(1):E58-E64.
- Schneider R. The effect of olive oil and oleic acid on gastric secretion in the rat. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1958; 43(4):418-426.
- Schwartz GF, Veronesi U, Clough KB, Dixon JM, Fentiman IS, Heywang-Köbrunner SH, Holland R, Hughes KS, Margolese R, Olivotto IA, Palazzo JP, Solin LJ. Consensus Conference Committee. Proceedings of the Consensus Conference on Breast Conservation, April 28 to May 1, 2005, Milan, Italy. *Cancer*. 2006; 107(2):242-250.
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23(36):9408-9421. Review.
- Scott RW, Olson MF. LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med*. 2007; 85(6):555-568. Review.
-

- Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2000; 275(37):28371-28379.
- Segev DL, Hoshiya Y, Stephen AE, Hoshiya M, Tran TT, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. Mullerian inhibiting substance regulates NFkappaB signaling and growth of mammary epithelial cells in vivo. *J Biol Chem.* 2001; 276(29):26799-26806.
- Semlali A, Oliva J, Badia E, Pons M, Duchesne MJ. Immediate early gene X-1 (IEX-1), a hydroxytamoxifen regulated gene with increased stimulation in MCF-7 derived resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 88(3):247-259.
- Sgambato A, Migaldi M, Montanari M, Camerini A, Brancaccio A, Rossi G, Cangiano R, Losasso C, Capelli G, Trentini GP, Cittadini A. Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *Am J Pathol.* 2003; 162(3):849-860.
- Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Sentürker S, Lee YJ. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood.* 2000; 96(1):307-313.
- Shan L, He M, Yu M, Qiu C, Lee NH, Liu ET, Snyderwine EG. cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis.* 2002; 23(10):1561-1568.
- Shan L, Yu M, Schut HA, Snyderwine EG. Susceptibility of rats to mammary gland carcinogenesis by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) varies with age and is associated with the induction of differential gene expression. *Am J Pathol.* 2004; 165(1):191-202.
- Shan L, Yu M, Snyderwine EG. Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis.* 2005a; 26(2):503-509.
- Shan L, Yu M, Snyderwine EG. Global gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland carcinomas and adenomas. *Toxicol Pathol.* 2005b; 33(7):768-775.
-

- Shen L, Guo J, Santos-Berrios C, Wu MX. Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem*. 2006; 281(22):15304-15311.
- Shen Q, Brown PH. Novel agents for the prevention of breast cancer: targeting transcription factors and signal transduction pathways. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003; 8(1):45-73. Review.
- Shi Y, He B, You L, Jablons DM. Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28(9):1499-14504.
- Shilkaitis A, Green A, Steele V, Lubet R, Kelloff G, Christov K. Neoplastic transformation of mammary epithelial cells in rats is associated with decreased apoptotic cell death. *Carcinogenesis*. 2000; 21(2):227-233.
- Shoushtari AN, Michalowska AM, Green JE. Comparing genetically engineered mouse mammary cancer models with human breast cancer by expression profiling. *Breast Dis*. 2007; 28:39-51. Review.
- Shull JD. The rat oncogenome: comparative genetics and genomics of rat models of mammary carcinogenesis. *Breast Dis*. 2007; 28:69-86. Review.
- Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233(6):674-688. Review.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175:184-191.
- Smith RE, Bryant J, DeCillis A, Anderson S. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *J Clin Oncol*. 2003a; 21(7):1195-1204.
- Smith RE. Risk for the development of treatment-related acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome among patients with breast cancer: review of the literature and the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Clin Breast Cancer*. 2003b; 4(4):273-279. Review.
- Snedeker SM. Chemical exposures in the workplace: effect on breast cancer risk among women. *AAOHN J*. 2006; 54(6):270-279. Review.
-

- Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menendez JA, Colomer R, Escrich E. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol.* 2002; 21(4):745-753.
- Sotiroudis TG, Kyrtopoulos SA, Xenakis A, Sotiroudis GT. Chemopreventive potential of minor components of olive oil against cancer. *Ital J Food Sci.* 2003; 15:169-185.
- Sotiroudis TG, Kyrtopoulos SA. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *Eur J Nutr.* 2008; 47(Suppl 2):S69-S72.
- Steensma DP, Gibbons RJ, Higgs DR. Acquired alpha-thalassemia in association with myelodysplastic syndrome and other hematologic malignancies. *Blood.* 2005; 105(2):443-452. Review.
- Stevens FA. The Bactericidal and Photochemical Properties of Irradiated Cod Liver Oil and an Ozonide of Olive Oil. *J Bacteriol.* 1936; 32(1):47-56.
- Stuhr LE, Moen I, Nedrebø T, Salnikov AV, Wiig H, Rubin K, Reed RK. Peritumoral TNFalpha administration influences tumour stroma structure and physiology independently of growth in DMBA-induced mammary tumours. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008; 68(7):602-611.
- Subashini R, Ragavendran B, Gnanapragasam A, Yogeeta SK, Devaki T. Biochemical study on the protective potential of *Nardostachys jatamansi* extract on lipid profile and lipid metabolizing enzymes in doxorubicin intoxicated rats. *Pharmazie.* 2007; 62(5):382-387.
- Supuran CT. Carbonic anhydrases as drug targets an overview. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7(9):825-833. Review.
- Suzuki T, Inoue A, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sasano H. Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocr Relat Cancer.* 2007; 14(2):279-292.

T

- Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 2001; 411(6835):349-354. Review.
-

- Takahashi S, Ito Y, Hatake K, Sugimoto Y. Gene therapy for breast cancer. Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. *Breast Cancer*. 2006; 13(1):8-15. Review
- Tang Y, Olufemi L, Wang MT, Nie D. Role of Rho GTPases in breast cancer. *Front Biosci*. 2008; 13:759-776. Review.
- Tannenbaum A. The genesis and growth of tumors. III Effects of a high fat diet. *Cancer Research*. 1942; 2:468-475.
- Thompson HJ, Singh M. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000; 5(4):409-420.
- Todorova VK, Harms SA, Kaufmann Y, Luo S, Luo KQ, Babb K, 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; 88:247-256.
- Todorova VK, Harms SA, Luo S, Kaufmann Y, Babb KB, Klimberg VS. Oral glutamine (AES-14) supplementation inhibits PI-3K/Akt signaling in experimental breast cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2003; 27(6):404-410.
- Todorova VK, Kaufmann Y, Luo S, Klimberg VS. Modulation of p53 and c-myc in DMBA-induced mammary tumors by oral glutamine. *Nutr Cancer*. 2006; 54(2):263-273.
- Todorovic R, Ariese F, Devanesan P, Jankowiak R, Small GJ, Rogan E, Cavalieri E. Determination of benzo[a]pyrene- and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in rat mammary glands. *Chem Res Toxicol*. 1997; 10(9):941-947.
- Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D. Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9(9):869-873. Review.
- Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. The role of human adult stem cells and cell-cell communication in cancer chemoprevention and chemotherapy strategies. *Mutat Res*. 2005; 591(1-2):187-197. Review.
- Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr*. 2001; 131(7):1993-1996.
-

Tuck KL, Hayball PJ, Stupans I. Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(8):2404-2409.

Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolar Z. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology.* 2006; 73(5):213-223. Review.

U

Uchihara T, Okubo C, Tanaka R, Minami Y, Inadome Y, Iijima T, Morishita Y, Fujita J, Noguchi M. Neuronatin expression and its clinicopathological significance in pulmonary non-small cell carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2007; 2(9):796-801.

Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, Yamaguchi I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101(2):151-158.

Utsunomiya T, Chavali SR, Zhong WW, Forse RA. Effects of sesamin-supplemented dietary fat emulsions on the ex vivo production of lipopolysaccharide-induced prostanoids and tumor necrosis factor alpha in rats. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(3):804-808.

V

Vachon CM, van Gils CH, Sellers TA, Ghosh K, Pruthi S, Brandt KR, Pankratz VS. Mammographic density, breast cancer risk and risk prediction. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(6):217-226. Review.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84. Review.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1):1-40. Review.

Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(9):659-672. Review.

- Vázquez SM, Mladovan AG, Pérez C, Bruzzone A, Baldi A, Lüthy IA. Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 58(1):50-61.
- Veena K, Shanthi P, Sachdanandam P. The biochemical alterations following administration of Kalpaamruthaa and Semecarpus anacardium in mammary carcinoma. *Chem Biol Interact.* 2006; 161(1):69-78.
- Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, Kunkler I. EUROCORE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-2002 period analysis of EUROCORE-4 data. *Lancet Oncol.* 2007; 8(9):784-796.
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347(16):1227-1232.
- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 2005; 44(2):121-127.
- Visioli F, Galli C, Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr.* 2003; 133(8):2612-2615.
- Visioli F, Grande S, Bogani P, Galli C. Antioxidant properties of olive oil phenolics. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 109-118pp, Oxford, U.K 2006.
- Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.* 2002; 22(1):65-75. Review.
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr.* 2002; 132(3):409-417.
- Vleugel MM, Greijer AE, Bos R, van der Wall E, van Diest PJ. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 2006; 37(6):668-674.
- Voon HP, Wardan H, Vadolas J. siRNA-mediated reduction of {alpha}-globin results in phenotypic improvements in {beta}-thalassemic cells. *Haematologica.* 2008. 93(8):1238-1242.
-

W

- Wagner H. The fatty acid composition of rats after feeding with butter, margarine, olive oil and sunflower oil. *Int Z Vitaminforsch Beih.* 1957; 28(1-2):192-193.
- Waljee JF, Newman LA. Neoadjuvant systemic therapy and the surgical management of breast cancer. *Surg Clin North Am.* 2007; 87(2):399-415. Review.
- Wang W, Zhang W, Han Y, Chen J, Wang Y, Zhang Z, Hui R. NELIN, a new F-actin associated protein, stimulates HeLa cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 330(4):1127-1131.
- Warren DL, Brown MK, Reed DJ. Modification of hepatic vitamin E stores in vivo. II. Alterations in plasma and liver vitamin E content by 1,2-dibromoethane. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 288(2):440-448.
- Watchko JF, O'Day TL, Hoffman EP. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol.* 2002; 93(2):407-417. Review.
- Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev.* 2007; 12(4):331-342. Review.
- Wayne SJ, Neuhouser ML, Ulrich CM, Koprowski C, Baumgartner KB, Baumgartner RN, McTiernan A, Bernstein L, Ballard-Barbash R. Dietary fiber is associated with serum sex hormones and insulin-related peptides in postmenopausal breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat.* 2007. 112(1):149-158.
- Weir ML, Muschler J. Dystroglycan: emerging roles in mammary gland function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003; 8(4):409-419.
- Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature.* 2008; 452(7187):580-589. Review.
- Wells WA, Schwartz GN, Morganelli PM, Cole BF, Gibson JJ, Kinlaw WB. Expression of "Spot 14" (THRSP) predicts disease free survival in invasive breast cancer: immunohistochemical analysis of a new molecular marker. *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 98(2):231-240.
- WHO. Statistical Information System (WHOSIS). <http://www.who.int/whosis/en/>
- Willett WC. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10(1):3-8.
-

- Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*. 1996; 120(1-2):15-23.
- Wong YC, Wang X, Ling MT. Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis*. 2004; 9(3):279-289. Review.
- Worsham MJ, Abrams J, Raju U, Kapke A, Lu M, Cheng J, Mott D, Wolman SR. Breast cancer incidence in a cohort of women with benign breast disease from a multiethnic, primary health care population. *Breast J*. 2007; 13(2):115-121.
- Wright J. Monounsaturated fat in the pathogenesis and treatment of diabetes. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 240-264pp, Oxford, U.K 2006.
- Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossman SF. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science*. 1998; 281(5379):998-1001.
- Wu MX. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis*. 2003; 8(1):11-18. Review.

X

- Xiang P, Deng HY, Li K, Huang GY, Chen Y, Tu L, Ng PC, Pong NH, Zhao H, Zhang L, Sung RY. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Apr 1. (Epub ahead of print).
- Xin YF, Zhou GL, Deng ZY, Chen YX, Wu YG, Xu PS, Xuan YX. Protective effect of Lycium barbarum on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res*. 2007; 21(11):1020-1024.
- Xu CL, Sim MK. Reduction of dihydroxyphenylacetic acid by a novel enzyme in the rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1995; 50(9):1333-1337.
- Xu Z, Le K, Moghadasian MH. Long-term phytosterol treatment alters gene expression in the liver of apo E-deficient mice. *J Nutr Biochem*. 2008; 19(8):545-554.
-

Y

- Yago MD, Martinez-Victoria E, Mañas M, Martinez MA, Mataix J. Plasma peptide YY and pancreatic polypeptide in dogs after long-term adaptation to dietary fats of different degrees of saturation: olive and sunflower oil. *J Nutr Biochem.* 1997; 8:502-507.
- Yakirevich E, Maroun L, Cohen O, Izhak OB, Rennert G, Resnick MB. Apoptosis, proliferation, and Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand expression in medullary carcinoma of the breast. *J Pathol.* 2000; 192(2):166-173.
- Yamashita S, Takahashi S, McDonell N, Watanabe N, Niwa T, Hosoya K, Tsujino Y, Shirai T, Ushijima T. Methylation silencing of transforming growth factor-beta receptor type II in rat prostate cancers. *Cancer Res.* 2008; 68(7):2112-2121.
- Yang C, Trent S, Ionescu-Tiba V, Lan L, Shioda T, Sgroi D, Schmidt EV. Identification of cyclin D1- and estrogen-regulated genes contributing to breast carcinogenesis and progression. *Cancer Res.* 2006; 66(24):11649-11658.
- Yaqoob P. Olive oil and immune function. En: Olive oil and Health (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publishing, 265-283pp, Oxford, U.K 2006.
- Yeung TK, Chakrabarti K, Wilding D, Hopewell JW. Modification of doxorubicin-induced cardiotoxicity: manipulation of the dosage schedule. *Hum Exp Toxicol.* 2002; 21(11):607-614.
- Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, Takeo S. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2003; 59(2):419-427.
- Yoshida M, Fujioka A, Nakano K, Kobunai T, Saito H, Toko T, Takeda S, Unemi N. Antitumor activity of menogaril alone, and in combination against human mammary cancer models in mice and rats. *Anticancer Res.* 1996; 16(3A):1155-1159.
- Young J, Wahle KW, Boyle SP. Cytoprotective effects of phenolic antioxidants and essential fatty acids in human blood monocyte and neuroblastoma cell lines: surrogates for neurological damage in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008; 78(1):45-59.
- Young S, Hallowes RC. Tumours of the mammary gland. *IARC Sci Publ.* 1973:31-73. Review.
-

Yu FL, Greenlaw R, Fang Q, Bender W, Yamaguchi K, Xue BH, Yu CC. Studies on the chemopreventive potentials of vegetable oils and unsaturated fatty acids against breast cancer carcinogenesis at initiation. *Eur J Cancer Prev.* 2004; 13(4):239-248.

Z

Zanetti SR, Maldonado EN, Aveldaño MI. Doxorubicin affects testicular lipids with long-chain (C18-C22) and very long-chain (C24-C32) polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res.* 2007; 67(14):6973-6980.

Zhang J, Pickering CR, Holst CR, Gauthier ML, Tlsty TD. p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2006; 66(21):10325-10331.

Zhang X, Ling MT, Wong YC, Wang X. Evidence of a novel antiapoptotic factor: role of inhibitor of differentiation or DNA binding (Id-1) in anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Sci.* 2007; 98(3):308-314.

Zhang Y, Pu X, Shi M, Chen L, Qian L, Song Y, Yuan G, Zhang H, Yu M, Hu M, Shen B, Guo N. c-Jun, a crucial molecule in metastasis of breast cancer and potential target for biotherapy. *Oncol Rep.* 2007a; 18(5):1207-1212.

Zhang Y, Pu X, Shi M, Chen L, Song Y, Qian L, Yuan G, Zhang H, Yu M, Hu M, Shen B, Guo N. Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. *BMC Cancer.* 2007b; 7:145-153.

