



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**ALTERACIÓN DE LOS PATRONES EPIGENÉTICOS
EN CÁNCER DE MAMA HUMANO Y EXPERIMENTAL
POR EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA
Y/O DE LA ENFERMEDAD**

Memoria presentada por CRISTINA RODRÍGUEZ MIGUEL para optar al grado de Doctor en Biología.

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

Cristina Rodríguez Miguel

Raquel Moral Cabrera

Eduard ESCRICH ESCRICHE

Bellaterra, marzo 2016.

Este trabajo ha sido cofinanciado en parte mediante ayudas del Plan Nacional I+D+I [2004-2007] AGL2006-0769/ALI y [2008-2011] AGL2011-24778, Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008-2012 (FPCO2008-165.396; FPCO2013-611.084), Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino (AAO2008-165.471) y Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español 2009-2013 (OIP2009-165.646) y “Departament de Salut i d’Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya” (GC2010-165.000). Los patrocinadores no han intervenido en el diseño del estudio, la obtención de datos, o el análisis e interpretación de los resultados de este trabajo.

A mis padres

*Y llegó sin avisarte,
y llegó sin preguntar
Y en tus ojos adentrarse,
y tu libertad llevarse
A donde nunca quiso estar.*

*Y se trajo el frío a casa,
y las ganas de llorar,
Y se atreve a andar diciendo
Que ya no te queda tiempo
Y que te tienes que marchar
Pero tu amor puede más, puede más.*

*Nadie sabe cuánto duele,
Ni lo cerca que se está
De rendirse ante el gigante,
De romperse a cada instante
Ante la cruda realidad.
Pero tu amor puede más, puede más.*

*Hay una luz siempre cerca,
Trae la oportunidad
A las princesas que sueñan
Que todo puede cambiar,
Y aunque el camino es amargo
Y sé que dolerá
Hasta el invierno más largo
Muere rendido ante el mar.*

*Ninguna estrella está sola,
Ni deja de brillar,
Aunque el silencio y las horas
Quieran hacerla llorar,
Llenas de luces las sombras
Callas la soledad
No eres el miedo que ahoga
Eres la vida que das.*

(Maldita Nerea - AECC)

¿Y tú, Cristina, qué quieres ser de mayor? Aún recuerdo cuando con tan sólo 10 años llena de orgullo contestaba que quería ser científica para investigar enfermedades y encontrar su cura. Pese a desconocer las dificultades que conllevaría ser investigadora, años después no dudé, ni por un instante, en embarcarme en este mundo, afrontando cada etapa con ilusión, curiosidad y unas inmensas ganas de aprender. Puede que el camino haya sido largo y lleno de obstáculos, pero sin duda cualquier propósito inspira siempre sacrificio y requiere de perseverancia. Es por ello que quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado durante este viaje...

Al Dr. Eduard Escrich Escriche, profesor del “Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d’Immunologia” de la “Universitat Autònoma de Barcelona”, y director del Grupo Multidisciplinario para el Estudio del Cáncer de Mama, gracias por haberme dado la oportunidad de ser participe en este proyecto. Por la dirección del mismo, así como por la dedicación y rigurosidad demostrada durante este periodo.

A la Dra. Raquel Moral Cabrera, profesora del “Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d’Immunologia” de la “Universitat Autònoma de Barcelona”, por la dirección de este trabajo y por la implicación y profesionalidad centradas en esta tesis.

A la Dra. Montserrat Solanas García, profesora del “Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d’Immunologia” de la “Universitat Autònoma de Barcelona”, gracias por los buenos momentos compartidos y por su apoyo en los momentos de flaqueza.

A mis compañeras de laboratorio Cristina y Elena gracias por ser como sois, por todos los momentos de risas y de frases célebres, por vuestros consejos y, sobretudo, por sacar lo mejor de mí. A mis compañeras Raquel E. y Elena V. por su complicidad y por haber formado parte también de este viaje, a Xieng por su euforia y expresividad, y a mi vecina de mesa Maribel por facilitarnos el día a día liberándonos del trabajo administrativo.

A Laura, Pedro, Nadia y Xavi por los buenos momentos vividos que, aún siendo breves, recuerdo con especial cariño. A Marta por haber sido mi primera compañera en el mundo de la investigación y por habernos reencontrado tiempo después. A Montse Moreno por su bondad y alegría, y a Isabel por hacer que una sepia sea algo más que un molusco. A Miguel por todos los años que hemos compartido haciendo “ciencia”, por su característico humor y su infinita imaginación. A Txell, la supermami del grupo, por su espontaneidad e ingenio y por ser un pilar fundamental en este viaje. Por último, a Alexia por su alegría, por sus dotes teatrales y su autenticidad, pero sobretudo gracias por enseñarme a sacarle provecho a la albúmina.

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

Al Dr. Alfons Modolell Roig, la Dra. Teresa Checa Ruiz, la Dra. Gemma Ferrandis Salvador, la Sra. Mercedes Martínez Lozano y la Sra. Ana Sancho Gómez, del Servicio de Oncología Médica del Instituto de Oncología Corachan (IDOC) de Barcelona, así como a la Dra. Laia Sánchez del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Consorcio Sanitario de Tarrasa (CST), por su inestimable colaboración en el proyecto y su continuo interés por este trabajo.

A todas las mujeres que han participado en este estudio, en especial a nuestras luchadoras diarias, cuya generosidad, implicación y valentía ha hecho posible la realización del mismo.

Al Dr. Miguel Ángel Martínez González del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Navarra por su colaboración en el análisis de los cuestionarios empleados en este trabajo.

A la Dra. María Paz Romero del “Departament de Tecnologia d’Aliments” de la “Universitat de Lleida” por su colaboración en la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

A Anna Mercader del “Centre de Recerca en Agrigenòmica” (CRAG) de la “Universitat Autònoma de Barcelona”, por su asesoramiento y colaboración en los análisis realizados por pirosecuenciación.

A los profesores y compañeros de la Unidad de Fisiología Médica por su simpatía y por haberme ofrecido su ayuda siempre que la he necesitado.

A Hortensia Ojeda, Mónica Espejo y Ghízlane El Korchi por su cordialidad y por facilitarnos el trabajo tanto a nivel administrativo como de laboratorio, y a Maite por la alegría y simpatía con la que nos recibe a diario.

A los miembros del P.A.S. de la Facultad de Medicina y a los vigilantes por su cordialidad y profesionalidad, y en especial a Albert por sus inigualables cafés.

A Antonio Velasco por la originalidad y profesionalidad demostrada en el diseño de la portada.

A la Dra. M^a Neus Carbó, profesora agregada del “Departament de Bioquímica i Biologia Molecular” de la “Universitat de Barcelona”, por haber sido la primera en confiar en mi capacidad investigadora y por haber fomentado mi vocación científica.

A mis compis de camarote Núria Climent, Cristina Rovira, Laia Miralles, Víctor Casanova e Isaac Naval por haberme enseñado a disfrutar de la ciencia. Gracias por vuestro cariño y apoyo durante todos estos años, por hacer que se me ilumine la cara cada vez que entro en el laboratorio y veo un rollo de parafilm y...por todo los demás... mastercard!

A mis “Ladies” Alba, Sarai y Ester por todos estos años compartidos, por nuestras reuniones recordando viejos tiempos y riéndonos de los actuales y, sobretodo, por su amistad y complicidad.

A la gran familia salsera de Seven Dance por haberme hecho disfrutar bailando, por todos esos momentos de risas y descoordinación, por su autenticidad y alegría. En especial a Javi y Ray por haberme enseñado que 1, 2, 3...5, 6, 7 son mucho más que números, por ser magníficos profesores y mejores personas. Gracias salseros porque sin saberlo lograsteis que por unas horas me evadiese de la realidad y disfrutase como una niña.

A mis “Bionenas” Ana Carolina, Mariona, Alba y Marta (Pisoni!!!) ya que, en cierta manera, todo empezó con vosotras. Sí bien una carrera es difícil, que mejor que rodearte de cuatro mosqueteras para afrontarla! Gracias por esos años de locura y por todos los que vendrán, por vuestro apoyo y amistad.

A mis “Ple-Bellas” por haber sido mi máximo apoyo durante este viaje, por su complicidad y comprensión en los momentos más difíciles. Gracias por vuestra incondicional amistad y por haber fantaseado junto a mí en nuestro mundo duquesil.

A Laura, ¿qué decirte que ya no sepas?, gracias por ser mi otra mitad, por tus consejos, comprensión y cariño. Por estar siempre ahí, incluso en los peores momentos, y por hacer que la palabra “amistad” se quede pequeña. A Ricard, mi “banderas” personal, por su autenticidad, su simpatía y sus inestimables consejos.

A mi yaya Ana por su dulzura y su fuerza, y por la gran admiración que siento hacia ella. A mis tíos/as Mari, Manolo, Leo y Manolo por vuestro cariño y apoyo, y por hacerme disfrutar de todos esos momentos de risas en familia. A mis primos Vanessa, Julián, Manel y Joan por

haber estado siempre ahí y haber sido pilares fundamentales en mi vida. Y a los peques de la familia Izan y Leire porque, aunque vosotros no lo sepáis, habéis sido la luz en la oscuridad, vuestra inocencia, vitalidad y alegría ha sido el motor que me ha dado energía en los momentos más difíciles.

A todos los Rodríguez, en especial a mi abuela Rosario y a Manolo, por vuestro cariño, alegría y vitalidad. Gracias a todos mis tíos/as y primos/as (no os enumero a todos porque sino hago otra tesis más sólo con vuestros nombres) por vuestro apoyo, autenticidad y por todos esos momentos en familia que hacen que uno se sienta orgulloso de lucir este apellido.

A Salva y Montse por haberme acogido en su casa desde el primer día como a uno más, a Xavi por su característico toque de humor, y a Kira, la petitona de la casa, porque como bien dicen “una mirada vale más que mil palabras”. Gracias familia por vuestro cariño, comprensión y consejos, habéis sido un gran apoyo para mí en esta etapa. Por cierto Salva, ahora que estoy más cerca del “Nobel” vas a tener que mimarme aún más.

A mis padres Alfonso e Isabel por todo el amor y ternura que me brindáis, por los valores inculcados y por ser un excelente ejemplo de sacrificio y esfuerzo. Gracias por exteriorizar siempre lo orgullosos que estáis de mí tanto a nivel personal como profesional, y por darme la fuerza necesaria para afrontar las adversidades. A mi hermano Dani por su amor incondicional, por confiar siempre en mí, por su ternura y, como no, por soportar mi carácter. Y a los juguetones de la casa Coco y Kai por sus efusivos recibimientos que logran calmar todos los males, por sus ataques de locura y por su alegría contagiosa.

Y, en especial, a Marc por ser el mejor compañero de viaje que jamás hubiese soñado, por su estoica paciencia y su comprensión, y por enseñarme a afrontar los problemas con valentía y optimismo.

“Nadie dijo que fuera fácil, pero tampoco imposible”.

..... **ÍNDICE** ■

INTRODUCCIÓN	1
A. <u>DESARROLLO, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA</u>	3
1. GLÁNDULA MAMARIA HUMANA	3
2. GLÁNDULA MAMARIA DE LA RATA	6
B. <u>CÁNCER DE MAMA</u>	10
1. FACTORES IMPLICADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	11
1.1. Factores endocrinos	12
1.2. Factores genéticos y epigenéticos	16
1.3. Factores ambientales	21
2. PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA	22
2.1. Cáncer de mama humano	22
2.2. Cáncer de mama experimental	24
C. <u>ESTILO DE VIDA Y CÁNCER DE MAMA</u>	26
1. FACTORES NUTRICIONALES	26
2. ACTIVIDAD FÍSICA.....	31
3. OTROS	32
D. <u>LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA: MECANISMOS</u>	35
1. CRECIMIENTO, MADURACIÓN SEXUAL Y OBESIDAD.....	35
2. INFLUENCIA SOBRE EL ESTATUS HORMONAL.....	37
3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR.....	38
4. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	41
5. ESTRÉS OXIDATIVO	42
6. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	44
7. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	46
E. <u>ALTERACIÓN DE LOS PATRONES EPIGENÉTICOS EN LA CARCINOGENÉISIS MAMARIA</u>	49
1. MECANISMOS EPIGENÉTICOS	49
1.1. Metilación del ADN.....	49
1.2. Modificación postraduccional de histonas	53
1.3. Remodelación de la cromatina.....	56
1.4. ARNs no codificantes	57
1.5. Interacción de los componentes epigenéticos	59
2. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER DE MAMA	62
2.1. Metilación del ADN.....	62
2.1.1. Metilación global del genoma	63
2.1.2. Metilación gen-específica.....	64
2.2. Modificación postraduccional de histonas	66
F. <u>INFLUENCIA DE FACTORES NUTRICIONALES Y DE ESTILO DE VIDA SOBRE LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN CÁNCER DE MAMA</u>	67
1. FACTORES NUTRICIONALES.....	67
2. ESTILO DE VIDA.....	72
G. <u>OBJETIVOS</u>	75
MATERIAL Y MÉTODOS	79
A. <u>DISEÑO DE LOS ESTUDIOS</u>	81
1. ESTUDIO EN HUMANOS	81
1.1. Diseño y sujetos de estudio	81
1.2. Caracterización de los sujetos de estudio: parámetros reproductivos e histopatológicos.....	83

1.3.	Caracterización de los sujetos de estudio: estilo de vida	84
1.3.1.	Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.....	85
1.3.2.	Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea.....	85
1.3.3.	Cuestionario de actividad física	85
1.3.4.	Determinación de marcadores dietéticos.....	86
2.	ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL.....	87
2.1.	Dietas experimentales	87
2.2.	Diseño experimental	91
B.	<u>TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR</u>	93
1.	ESTUDIO DEL PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN	94
1.1.	Obtención y modificación de ADN total	94
1.1.1.	Extracción y purificación de ADN total.....	94
1.1.2.	Modificación del ADN por bisulfito sódico.....	95
1.2.	Determinación de la metilación global del genoma	97
1.2.1.	Análisis de secuencias genómicas repetitivas tipo LINE-1 (“Long Interspersed Nuclear Element-1”)	97
1.2.2.	Análisis de la metilación global por LUMA (“Luminometric Methylation Assay”)	99
1.3.	Determinación de la metilación gen-específica	101
1.3.1.	Análisis cualitativo del estado de metilación del ADN por MSP (“Methylation Specific PCR”).....	101
1.3.2.	Análisis semi-cuantitativo del estado de metilación del ADN por COBRA (“Combined Bisulfite Restriction Assay”).....	107
1.3.3.	Análisis cuantitativo del estado de metilación del ADN por pirosecuenciación.....	111
2.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	114
2.1.	Extracción y purificación de ARN total.....	114
2.2.	Análisis de la expresión de ARNm. Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (“Real-Time PCR”)	115
3.	ESTUDIO DE PROTEÍNAS.....	117
3.1.	Determinación de la actividad enzimática ADN metiltransferasa	117
3.1.1.	Obtención y cuantificación de extractos proteicos nucleares.....	117
3.1.2.	Determinación de la actividad ADN metiltransferasa	118
3.2.	Determinación de los niveles globales de modificaciones postraduccionales de histonas	119
C.	<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	121
1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO EN HUMANOS	121
2.	BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.....	122
RESULTADOS	123	
A.	<u>ESTUDIO EN HUMANOS</u>	125
1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ANTROPOMÉTRICOS	125
2.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: ESTILO DE VIDA.....	126
3.	ESTUDIO EPIGENÉTICO EN HUMANOS: METILACIÓN DEL ADN.....	139
1.1.	Determinación de los niveles de metilación global del genoma	139
1.2.	Determinación cualitativa de la metilación gen-específica	140
1.2.1.	Genes implicados en regulación de la capacidad proliferativa ilimitada: BRCA1, p16 y RARβ2	144
1.2.2.	Genes implicados en autosuficiencia en señales de proliferación: ESR1, PRB y RASSF1A	146
1.2.3.	Gen implicado en insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento: NES1	148
1.2.4.	Gen implicado en evasión de la apoptosis: TWIST1	148
1.2.5.	Gen implicado en inducción de la angiogénesis: MASPINA	149

1.2.6. Genes implicados en activación de la invasión y metástasis: CXCL12 y CDH1	150
1.2.7. Gen implicado en evasión del sistema inmune: HLA-A.....	151
1.3. Determinación cuantitativa de la metilación gen-específica.....	152
4. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y DE ESTILO DE VIDA SOBRE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÁNCER DE MAMA HUMANO	158
4.1. Influencia de los parámetros clínicos sobre la metilación del ADN.....	158
4.2. Influencia del estilo de vida sobre la metilación del ADN	165
B. ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL	176
1. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES	176
1.1. Niveles de expresión génica en glándula mamaria a diferentes edades	176
1.2. Niveles de expresión génica en adenocarcinomas mamarios.....	179
1.3. Comparación de los niveles de expresión génica entre ambos tejidos.....	180
2. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: METILACIÓN DEL ADN.....	181
2.1. Metilación global del genoma	181
2.2. Metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3	183
2.3. Caracterización de las enzimas ADN metiltransferasas	189
2.3.1 Expresión génica de ADN metiltransferasas	189
2.3.2 Actividad ADN metiltransferasa total	195
3. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS.....	196
4. CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL MODELO EXPERIMENTAL	200
DISCUSIÓN.....	207
A. ESTUDIO EN HUMANOS	209
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ANTROPOMÉTRICOS	209
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: ESTILO DE VIDA.....	210
3. ESTUDIO EPIGENÉTICO EN HUMANOS: METILACIÓN DEL ADN.....	217
3.1. Metilación global del genoma	217
3.2. Metilación gen-específica.....	221
B. ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL	231
1. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES	232
2. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: METILACIÓN DEL ADN.....	234
2.1. Metilación global del genoma	234
2.2. Metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3	237
2.3. Caracterización de las enzimas ADN metiltransferasas	239
3. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS.....	242
C. BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS	244
CONCLUSIONES	253
BIBLIOGRAFÍA.....	261
ANEXO	301

FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria humana	3
Figura 2. Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara	7
Figura 3. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria.....	8
Figura 4. Topografía de la glándula mamaria de la rata	9
Figura 5. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres.....	11
Figura 6. Mecanismos de desmetilación del ADN de forma activa.....	52
Figura 7. Imagen representativa de proteínas con dominios específicos de unión a modificaciones de histona	53
Figura 8. Representación esquemática de las modificaciones postraduccionales de las histonas y su implicación en la regulación génica.....	55
Figura 9. Mecanismos de acción de los complejos remodeladores de la cromatina	57
Figura 10. Esquema ilustrativo de la interacción entre elementos implicados en la metilación del ADN y la modificación postraducciona de las histonas	59
Figura 11. Esquema de las principales interacciones entre los componentes epigenéticos	62
Figura 12. Genes frecuentemente metilados durante el transcurso del proceso carcinogénico mamario	65
Figura 13. Influencia de factores nutricionales en la formación de SAM.....	68
Figura 14. Diseño experimental del estudio en el modelo murino	92
Figura 15. Imagen de la conversión de los nucleótidos de citosina durante la modificación del ADN por bisulfito sódico.....	96
Figura 16. Pirograma representativo del ensayo “LUMA”.....	100
Figura 17. Genes de interés relacionados con las capacidades adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo neoplásico.....	101
Figura 18. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen RASSF1A amplificada por PCR en la técnica “COBRA” en el estudio en humanos	108
Figura 19. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen ESR1 amplificada por PCR en la técnica “COBRA” en el estudio en humanos.....	110
Figura 20. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen BRCA1 amplificada por PCR y analizada por pirosecuenciación en el estudio en humanos.....	112
Figura 21. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen ESR1 amplificada por PCR y analizada por pirosecuenciación en el estudio en humanos	112
Figura 22. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen RASSF1A analizada por pirosecuenciación en el estudio en humanos.....	113
Figura 23. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen RASSF1A analizada por pirosecuenciación en el estudio en el modelo experimental.....	114
Figura 24. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen TIMP3 analizada por pirosecuenciación en el estudio en el modelo experimental	114
Figura 25. Cromatograma representativo de la determinación del perfil de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos.....	129
Figura 26. Perfil de ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama.....	131
Figura 27. Perfil de ácidos grasos agrupados en función del tipo en la membrana de los eritrocitos en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama	132
Figura 28. Pirograma representativo de la determinación de la metilación global del ADN en las muestras humanas	139
Figura 29. Grado de metilación global del ADN (% metilación de secuencias LINE-1) en los distintos tejidos.....	140
Figura 30. Distribución de la detección por “MSP” del alelo metilado de los diferentes genes de interés	141

Figura 31. Determinación cualitativa por “MSP” de la metilación de los diferentes genes de interés en muestras de elementos formes de voluntarias sanas (A) y de enfermas de cáncer de mama (B).....	142
Figura 32. Determinación cualitativa por “MSP” de la metilación de los diferentes genes de interés en muestras de glándula mamaria (A) y tumor (B)	143
Figura 33. Determinación cualitativa de la metilación del gen BRCA1 por “MSP” en los distintos tejidos	144
Figura 34. Determinación cualitativa de la metilación del gen p16 por “MSP” en los distintos tejidos	145
Figura 35. Determinación cualitativa de la metilación del gen RARβ2 por “MSP” en los distintos tejidos	145
Figura 36. Determinación cualitativa de la metilación del gen ESR1 por “MSP” en los distintos tejidos	146
Figura 37. Determinación cualitativa de la metilación del gen PRB por “MSP” en los distintos tejidos.....	147
Figura 38. Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A por “MSP” en los distintos tejidos.....	147
Figura 39. Determinación cualitativa de la metilación del gen NES1 por “MSP” en los distintos tejidos.....	148
Figura 40. Determinación cualitativa de la metilación del gen TWIST1 por “MSP” en los distintos tejidos.....	149
Figura 41. Determinación cualitativa de la metilación del gen MASPINA por “MSP” en los distintos tejidos.....	149
Figura 42. Determinación cualitativa de la metilación del gen CXCL12 por “MSP” en los distintos tejidos....	150
Figura 43. Determinación cualitativa de la metilación del gen CDH1 por “MSP” en los distintos tejidos.....	151
Figura 44. Determinación cualitativa de la metilación del gen HLA-A por “MSP” en los distintos tejidos.....	151
Figura 45. Pirograma representativo de la determinación cuantitativa de la metilación del gen BRCA1 en las muestras humanas	152
Figura 46. Grado de metilación del gen BRCA1 en los distintos tejidos	153
Figura 47. Análisis “COBRA” para la determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen ESR1 en las muestras humanas.....	153
Figura 48. Determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen ESR1 por “COBRA” en los distintos tejidos.....	154
Figura 49. Pirograma representativo de la determinación cuantitativa de la metilación del gen ESR1 en las muestras humanas.....	155
Figura 50. Grado de metilación del gen ESR1 en los distintos tejidos.....	155
Figura 51. Análisis “COBRA” para la determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A en las muestras humanas.....	156
Figura 52. Determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A por “COBRA” en los distintos tejidos	157
Figura 53. Pirograma representativo de la determinación cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A en las muestras humanas.....	157
Figura 54. Grado de metilación del gen RASSF1A en los distintos tejidos	158
Figura 55. Expresión relativa del ARNm de RASSF1A en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	176
Figura 56. Expresión relativa del ARNm de TIMP3 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	177
Figura 57. Expresión relativa del ARNm de CDKN2c en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	178
Figura 58. Expresión relativa del ARNm de RASSF1A (A), TIMP3 (B) y CDKN2c (C) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo.....	179
Figura 59. Comparación de los niveles de expresión relativa del ARNm de RASSF1A (A), TIMP3 (B) y CDKN2c (C) en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo.....	180
Figura 60. Grado de metilación global del ADN en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades.....	181
Figura 61. Grado de metilación global del ADN en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo	182
Figura 62. Comparación del grado de metilación global del ADN entre glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo.....	182

Figura 63. Imagen representativa de la detección del alelo metilado y no metilado en la determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A por “MSP”	183
Figura 64. Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A en glándula mamaria al final del ensayo.....	183
Figura 65. Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo.....	184
Figura 66. Comparación de las frecuencias de metilación del gen RASSF1A en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo	184
Figura 67. Pirogramas representativos de la determinación cuantitativa de la metilación de los genes RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en el estudio en el modelo experimental.....	185
Figura 68. Grado de metilación del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en glándula mamaria al final del ensayo	186
Figura 69. Grado de metilación del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo	187
Figura 70. Comparación del grado de metilación del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo	188
Figura 71. Expresión relativa del ARNm de DNMT1 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades	190
Figura 72. Expresión relativa del ARNm de DNMT3a en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades	191
Figura 73. Expresión relativa del ARNm de DNMT3b en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades	192
Figura 74. Expresión relativa del ARNm de DNMT1 (A), DNMT3a (B) y DNMT3b (C) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo	193
Figura 75. Comparación de los niveles de expresión relativa del ARNm de DNMT1 (A), DNMT3a (B) y DNMT3b (C) en glándula mamaria y adenocarcinomas al final del ensayo.....	194
Figura 76. Niveles de actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria de los grupos experimentales al final del ensayo	195
Figura 77. Niveles de actividad ADN metiltransferasa en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo	195
Figura 78. Comparación de los niveles de actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria y adenocarcinomas de los grupos experimentales al final del ensayo.....	196
Figura 79. Imagen representativa de la detección por Western Blot de las modificaciones postraduccionales de histonas	197
Figura 80. Niveles relativos de modificaciones postraduccionales de histonas en glándula mamaria de los grupos experimentales al final del ensayo.....	198
Figura 81. Niveles relativos de modificaciones postraduccionales de histonas en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo.....	199
Figura 82. Comparación de los niveles relativos de modificaciones postraduccionales de histonas en glándula mamaria y adenocarcinomas de los grupos experimentales al final del ensayo	200

TABLAS

Tabla 1. Listado de los ácidos grasos analizados por cromatografía de gases para la determinación de marcadores dietéticos en el estudio en humanos	87
Tabla 2. Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta).....	88
Tabla 3. Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados en el estudio en el modelo experimental	89
Tabla 4. Otros compuestos analizados de los aceites utilizados en el estudio en el modelo experimental	90
Tabla 5. Cebadores utilizados en el análisis por “MSP” en el estudio en humanos y en el modelo experimental	103
Tabla 6. Condiciones de amplificación utilizadas en el análisis por “MSP” en el estudio en humanos y en el modelo experimental.....	104
Tabla 7. Ensayos TaqMan [®] utilizados en el estudio de la expresión génica mediante “Real-Time PCR”.....	117
Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados y condiciones de los ensayos Western Blot para la determinación de los niveles globales de modificaciones postraduccionales de histonas	121
Tabla 9. Parámetros reproductivos y antropométricos de los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama	126
Tabla 10. Características del estilo de vida de los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama.....	127
Tabla 11. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos saturados en la membrana de los eritrocitos.....	135
Tabla 12. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los eritrocitos.....	136
Tabla 13. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 6 en la membrana de los eritrocitos.....	137
Tabla 14. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en la membrana de los eritrocitos.....	138
Tabla 15. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación del ácido graso con isomería <i>trans</i> (ácido eláidico) en la membrana de los eritrocitos	138
Tabla 16. Correlación entre parámetros reproductivos de los individuos y datos moleculares de los distintos tejidos.....	160
Tabla 17. Asociación entre parámetros reproductivos de los individuos y datos moleculares de los distintos tejidos.....	161
Tabla 18. Asociación entre parámetros histopatológicos tumorales y datos moleculares de los distintos tejidos de las enfermas de cáncer de mama.....	164
Tabla 19. Asociación entre parámetros de estilo de vida y datos moleculares de los distintos tejidos.....	167
Tabla 20. Correlación entre parámetros nutricionales obtenidos de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y datos moleculares de los distintos tejidos	168
Tabla 21. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos saturados en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos	172
Tabla 22. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos monoinsaturados en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos.....	173
Tabla 23. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 6 en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos.....	174
Tabla 24. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos.....	175
Tabla 25. Correlación entre la cuantificación del ácido graso con isomería <i>trans</i> (ácido eláidico) en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos.....	175

ÍNDICE

Tabla 26. Frecuencia de hipermetilación (%) del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) respecto al grupo control en glándula mamaria al final del ensayo.....	186
Tabla 27. Frecuencia de hipermetilación (%) del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) respecto al grupo control en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo.....	188
Tabla 28. Frecuencia de hipermetilación (%) del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en adenocarcinomas mamarios respecto a glándula mamaria al final del ensayo.....	189
Tabla 29. Correlación de los datos moleculares obtenidos en glándula mamaria al final del ensayo.....	203
Tabla 30. Correlación de los datos moleculares obtenidos en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo.....	204
Tabla 31. Correlación de los datos moleculares y los parámetros clínicos e histopatológicos de los adenocarcinomas en los diferentes grupos experimentales al final del ensayo.....	205
Tabla 32. Correlación de los datos moleculares y los parámetros clínicos e histopatológicos de los adenocarcinomas al final del ensayo.....	206

ANEXO

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos	303
Anexo 2. Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea	307
Anexo 3. Cuestionario de frecuencia de práctica de actividades físicas	308
Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental.....	310

ABREVIATURAS

C	grupo experimental control (dieta normolipídica)
Mip	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz desde el destete
Mp	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz desde la inducción con DMBA
Oip	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen desde el destete
Op	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen desde la inducción con DMBA
Dieta m3	dieta experimental normolipídica
Dieta M20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de maíz
Dieta mO20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra
5mC	5-metilcitosina
5hmC	5-hidroxi-metilcitosina
8-oxo-dG	8-oxo-deoxiguanosina
AB	yema alveolar
ADM	adherencia a la Dieta Mediterránea
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	adenosín difosfato
AID	citidina desaminasa inducida por activación
AO	ácido oleico
APOBEC	complejo enzimático de edición de ARNm apolipoproteína B
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín trifosfato
BER	reparación por escisión de base
BPA	bisfenol-A
BRCA	“breast cancer”
BSA	albúmina sérica bovina
caC	carboxil-citosina
CDH1	gen codificante de E-cadherina
CDK	quinasa dependiente de ciclina
CDKN2c	“cyclin-dependent kinase inhibitor 2C” (p18-INK4)
CK	citoqueratina
CLA	ácido linoleico conjugado
COBRA	“COMbined Bisulfite Restriction Assay”
COX	cicloxigenasa
CpG	“cytosine-phosphate-guanine”
Ct	“cycle threshold”
CXCL12	“C-X-C motif chemokine 12”
CYP	citocromo P450
D.O.	densidad óptica
DAG	ácido diacilglicerol
DBP	“DNA binding protein”
DGLA	ácido diomo- γ -linolenico
DHA	ácido docosaheptaenoico
DMBA	7,12-dimetilbenz(α)antraceno
DNMT1	ADN metiltransferasa 1
DNMT3a	ADN metiltransferasa 3a
DNMT3b	ADN metiltransferasa 3b

dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
E ₂	17β-estradiol
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
EF	elementos formes
EGCG	epigallocatequina-3-galata
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del EGF
EPA	ácido eicosapentaenoico
EPIC	“European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition”
ERE	elemento de respuesta a estrógenos
ESR1	gen codificante del RE alfa
EZH2	histona metiltransferasa “enhancer of zeste homolog 2”
FABP	proteína de transpore de ácidos grasos
fC	formil-citosina
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FSH	hormona estimulante del folículo
G9a	histona metiltransferasa “Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2- EHMT2”
GM	glándula mamaria
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GST	glutación-S-transferasa
H3	histona 3
H3K27me3	tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3
H3K4me2	di-metilación de la lisina 4 de la histona 3
H4	histona 4
H4K16ac	acetilación de la lisina 16 de la histona 4
H4K20me3	tri-metilación de la lisina 20 de la histona 4
HAT	histona acetiltransferasa
hCG	hormona gonadotropina coriónica
HDAC	histona desacetilasa
HDMT	histona desmetilasa
HER2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (ErB2/neu)
HLA-A	antígeno leucocitario humano A
hMOF	histona acetiltransferasa “human orthologue of MOF”
HMT	histona metiltransferasa
hPL	hormona del lactógeno placentario
Hprt1	“hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1”
hTERT	telomerasa transcriptasa inversa humana
ICC	índice cintura-cadera
IDP	proliferación intraductal
IGF	factor de crecimiento insulínico
IL	interleucina
IMC	índice de masa corporal
IP ₃	inositol-trifosfato
Kb	kilobase (1000 pares de bases)
LH	hormona luteinizante
LINE-1	“long interspersed nuclear element-1”
lncRNA	“large non coding RNA”
LOI	pérdida de impronta
LUMA	“LUminometric Methylation Assay”

ÍNDICE

MAPK	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MASPINA	serpina mamaria
MBP	“methyl-CpG binding protein”
MeCP2	“methyl-CpG binding protein 2”
MET	unidad de medida del índice metabólico
MgCl ₂	cloruro de magnesio
miRNA	“microRNA”
MMP	metaloproteasas de matriz extracelular
MMR	reparación por error en el apareamiento
MSP	“Methylation Specific PCR”
MUFA	ácidos grasos monoinsaturados
ncRNA	“non coding RNA”
NER	reparación por escisión de nucleótido
NES1	“normal epithelial cell-specific-1/kallikrein 10”
OEA	oleiletanolamida
p16	inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A)
pb	pares de bases
PCNA	antigen nuclear de proliferación celular
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR1	complejo represor polycomb 1
PCR2	complejo represor polycomb 2
PDFG	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE	prostaglandina E
PIC	“protease inhibitor cocktail”
piRNA	“PIWI-interacting RNA”
PKC	proteína quinasa C
PLA	fosfolipasa A
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PPAR	receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PRB	receptor de progesterona B
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
RARβ2	receptor de ácido retinoico beta 2
RASSF1A	“ras association domain family 1 isoform A”
RE	receptor de estrógenos
RISC	complejo de silenciamiento inducido por ARN
ROS	especies reactivas de oxígeno
RP	receptor de progesterona
SAHA	ácido hidroxámico suberoilánilida
SAM	S-adenosil-L-metionina
SDS	dodecilsulfato sódico
SERM	moduladores selectivos de los receptores estrogénicos
SINE	“short interspersed nuclear element”
siRNA	“small interfering RNA”
snoRNA	“small nucleolar RNA”
SOD	superóxido dismutasa
T	tumor
TAE	tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
TD	ductos terminales
TDLU	unidad ductulo-lobulillar tipo 1
TEB	yemas terminales
TET	“ten-eleven translocation”

TGF	factor de crecimiento transformante
TIMP3	“tissue inhibitor of metalloproteinasa 3”
TNF	factor de necrosis tumoral
TRx	tiorredoxina
TSA	tricostatina A
TWIST1	“twist-related protein 1”
Uhrf1	“ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1”
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular

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

INTRODUCCIÓN

A. DESARROLLO, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA

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

1. GLÁNDULA MAMARIA HUMANA

El desarrollo de la glándula mamaria humana tiene lugar a lo largo de la vida del individuo, tal y como se esquematiza en la Figura 1.

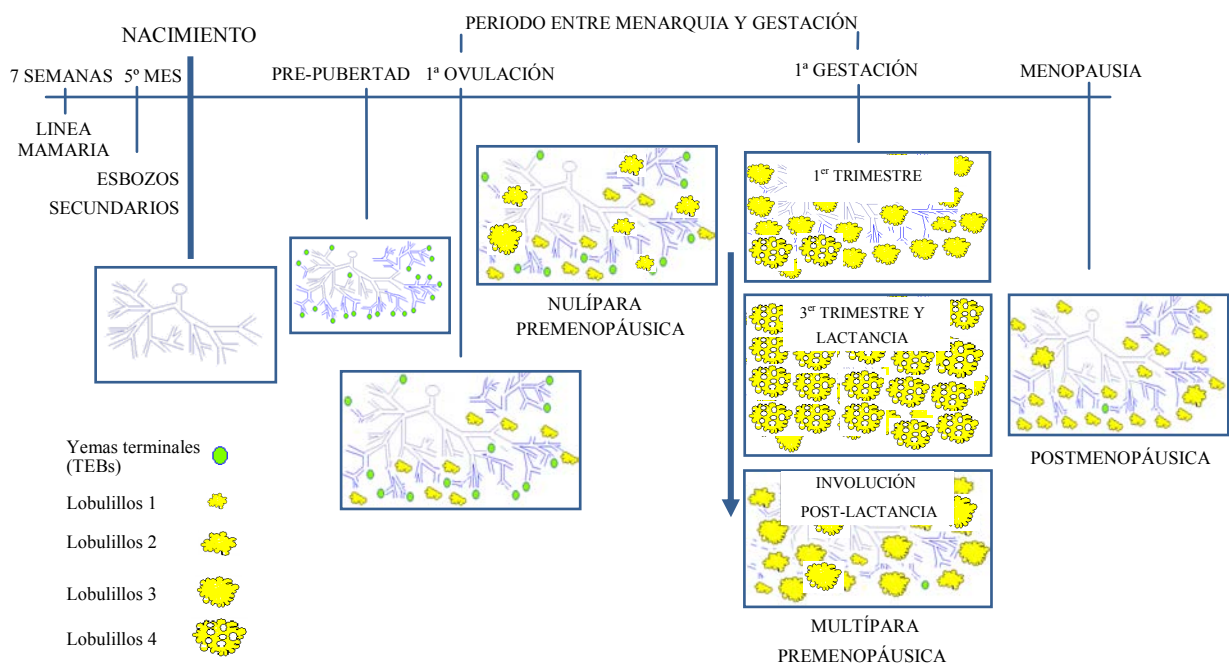


Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria humana.

Embriológicamente, la glándula mamaria deriva de un esbozo ectodérmico, conocido como línea o banda mamaria, que aparece hacia la quinta semana de vida como un par de áreas de engrosamiento de la epidermis que se extienden desde las axilas hasta la región inguinal. Hacia la séptima semana de vida, las líneas mamarias involucionan restando como

dos masas epiteliales sólidas en la región torácica que empiezan a crecer hacia el mesénquima subyacente. En el recién nacido, la glándula mamaria consiste en un sistema rudimentario ramificado de ductos que permanece quiescente hasta la pubertad. El crecimiento de la mama será isométrico con la proliferación del tejido estromal y proporcional al crecimiento medio del cuerpo ([583], [586], [1030], [2633]). Poco antes de la menarquia, y con el inicio de la maduración folicular en el ovario, el parénquima mamario entra en una fase de crecimiento, con división de la estructura tubular y aparición de los ductos mamarios primarios y secundarios, que terminan en unas formaciones bulbosas o yemas terminales ([3503], [7671]). Con las primeras ovulaciones, estas formaciones inmaduras dan lugar a las yemas alveolares o ductulillos, que se disponen alrededor de un ducto, constituyendo los lobulillos tipo 1, que representan la unidad funcional básica de la mama humana o unidad ductulo-lobulillar terminal (“terminal ductal lobular unit” o TDLU). Cada lobulillo tipo 1 contiene de 6 a 11 ductulillos. Durante la etapa fértil de la mujer, se observan dos formas adicionales de lobulillos, el tipo 2 y el 3, cuya transición se asocia a formación de nuevas yemas alveolares (hasta 47 en el tipo 2 y hasta 80 en el tipo 3), con un incremento en el tamaño lobulillar. Los lobulillos tipo 1 y 2 se observan predominantemente en mujeres nulíparas, mientras que la progresión a lobulillo tipo 3 es estimulada por la gestación ([3165], [3503]). El desarrollo de los lobulillos está regulado por los cambios hormonales que acontecen durante cada ciclo menstrual y, en especial, durante el embarazo. Así, durante la fase folicular se produce un crecimiento activo del sistema glandular, que alcanza un máximo en la fase luteal y va seguido de una rápida involución. El balance entre proliferación e involución en edades reproductivas tempranas favorece la proliferación, con una progresión de la población celular en cada ciclo ovulatorio ([2631], [2633], [2638], [3123], [3332]). Los cambios cíclicos en los niveles de estrógenos y progesterona ováricos durante cada ciclo menstrual y su acción sinérgica son necesarios para el crecimiento armónico de la glándula mamaria ([2631], [4577]). Asimismo, interviene una compleja secuencia hormonal en la que participan prolactina, insulina, cortisol, tiroxina, hormona del crecimiento y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) ([583], [586], [1030], [2631], [2632], [2639], [3332], [3334], [3372]). El tejido adiposo mamario también ejerce una influencia significativa sobre el crecimiento y el desarrollo del epitelio glandular, de modo que es necesaria la interacción entre ambos tejidos para que se produzca la morfogénesis normal mamaria ([895], [2633]).

La mama humana adulta normal consta de 15 a 25 ductos galactóforos que drenan los lóbulos mamarios, constituidos a su vez por numerosos lobulillos. Los lobulillos constan de un ducto terminal intralobulillar y múltiples ductillos rodeados por tejido conectivo intra y perilobulillar. Los ductos galactóforos nacen en el pezón, descienden una corta distancia donde se expanden como ampollas (senos lactíferos), ramificándose en conductos más delgados que conducen hasta los lobulillos. Estudios de caracterización fenotípica de las células que revisten los lobulillos mamarios han demostrado una heterogeneidad celular considerable, con presencia de células que expresan citoqueratinas (CK) de alto (CK5/6/14) y bajo peso molecular (CK8/18/19) y marcadores de diferenciación a músculo liso, como la actina músculo liso específica (“smooth muscle” o sm-actina). Parece ser que las células que expresan CK5/6/14 serían precursoras comunes, diferenciándose progresivamente, por un lado, hacia una vía epitelial luminal (CK8/18/19 positiva) y, por otro lado, hacia células mioepiteliales que expresan sm-actina, y se localizan tanto en la capa luminal como en la capa basal del ductillo mamario ([7266]).

Durante el embarazo se produce la expansión plena del sistema lobulilloalveolar necesaria para la secreción de leche, alcanzándose el estado de máxima diferenciación de la glándula mamaria ([453], [583], [1030], [2631], [2632], [2636], [2637]). A lo largo del primer trimestre de gestación, se observa una proliferación y una ramificación de los elementos distales del árbol ductal, con aparición de numerosos lobulillos tipo 3 ([2633], [3503]). En el segundo trimestre, se observa diferenciación de los ductillos a acinos o alvéolos, con capacidad de secreción láctea, constituyendo los lobulillos tipo 4 que aumentan progresivamente y se hacen más secretores. Durante el último trimestre, se produce un rápido desarrollo lobulilloalveolar dependiente de la acción de múltiples hormonas, tales como los estrógenos, la progesterona, la prolactina, la hormona gonadotropina coriónica (hCG), la hormona del lactógeno placentario (hPL), entre otras ([3503]).

Después del parto y tras la eliminación de la placenta se produce una caída brusca de los niveles de estrógenos y progesterona, permitiendo a la prolactina ejercer su papel lactogénico. A los 3 ó 4 días después del parto, las mamas comienzan a secretar grandes cantidades de leche en lugar del escaso calostro de los primeros días. El estado hormonal que estimula y mantiene la lactancia está garantizado por un reflejo neurohormonal inducido por el efecto mecánico de la succión que permite la secreción de prolactina ([3332], [3503]).

Cuando cesa la lactancia, la glándula mamaria interrumpe su actividad secretora y sufre una fase de regresión rápida, con una disminución de los elementos glandulares y reaparición del componente estromal interlobulillar y adiposo. Dentro del epitelio alveolar aparece una

importante actividad autofágica y lisosomal que elimina los restos celulares. Se ha observado sobreexpresión de genes proapoptóticos, como Bcl-XS, p53, c-fos, c-jun o Bax, regulada por factores de crecimiento y equilibrada por los TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) ([3104], [3105]). La mayoría de los lobulillos regresan, retornando a lobulillos tipo 3 y 2. El lobulillo tipo 3 es la estructura glandular predominante en las mamas de mujeres premenopáusicas multíparas. Las gestaciones repetidas extienden la diferenciación lobulillar ([3165], ([3503]).

Después de la menopausia, la caída de las hormonas ováricas causa la involución progresiva de los tejidos epitelial y conectivo. El componente ductulo-lobulillar se atrofia, la matriz fibrosa se hace más densa y el parénquima es sustituido por tejido adiposo y conectivo ([2632]). La mayoría de los lobulillos adquieren la apariencia morfológica de los tipos 1. La actividad proliferativa de estos lobulillos tipo 1 es menor en las glándulas mamarias de mujeres postmenopáusicas multíparas que en las nulíparas, lo que indica que la gestación puede imprimir cambios permanentes en las características biológicas de estas estructuras ([3165], [3923], [3924]). El grado de diferenciación al cual llega la glándula mamaria durante el embarazo es un factor importante que se opone a la transformación neoplásica del órgano, lo que determina una diferencia fundamental entre las mujeres nulíparas y las que han tenido por lo menos un hijo, en cuanto a factores de riesgo de cáncer mamario ([603], [861], [2226], [7671]).

2. GLÁNDULA MAMARIA DE LA RATA

A diferencia de los humanos, la rata posee 6 pares de glándulas mamarias distribuidas subcutáneamente a lo largo de dos líneas ventrolaterales, desde la región cervical a la inguinal: un par en la región cervical, dos en la región torácica, dos en la abdominal y uno en la inguinal ([1141]). El desarrollo de la glándula mamaria de la rata hembra virgen nulípara se esquematiza en la Figura 2.

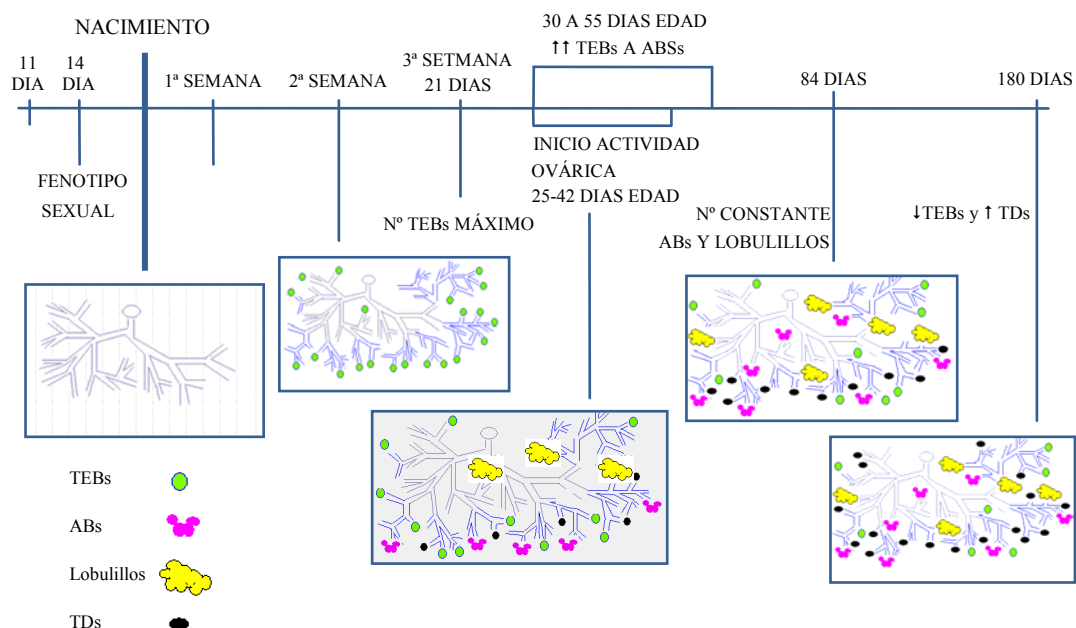


Figura 2. Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara.

El primer esbozo de glándula mamaria aparece en los primeros días de gestación como estructuras de crecimiento alargadas de ectodermo, constituyendo las yemas embrionarias. El crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias será proporcional al resto del cuerpo hasta la pubertad ([3122]). En la rata Sprague-Dawley, la glándula mamaria evoluciona desde un ducto galactóforo mayor primordial que nace del pezón y que se ramifica en ductos secundarios, cuyas longitudes y número de ramas secundarias y terciarias aumentarán con la edad del animal ([3122]). Hacia la segunda semana de vida, la glándula muestra ductos con ramificaciones que en su extremo presentan las yemas terminales o “terminal end buds” – TEBs– (son el equivalente de las TDLU humanas), considerados los centros de crecimiento activo y el elemento primitivo del parénquima mamario. El número de TEBs es máximo cuando la rata tiene 21 días de edad. A partir de aquí, coincidiendo con el período prepuberal y el inicio de la actividad ovárica, los TEBs inician la diferenciación y septación a 3 - 5 yemas alveolares (o “alveolar buds” - ABs). Esta diferenciación progresiva se acentuará en cada ciclo estral, que se inicia cuando el animal tiene de 25 a 42 días de edad. Los ABs, a su vez, y en los sucesivos ciclos estrales, iniciaran el desarrollo lobulillar, con aparición de lobulillos tipo 1 y 2 ([3165]). En las ratas vírgenes este proceso continúa durante la maduración sexual hasta que se consigue un número constante de ABs y lobulillos, que acontece hacia los 84 días de edad ([943]). Un número elevado de TEBs sufrirá hipoplasia en la rata virgen, constituyendo los ductos terminales (o “terminal ducts” - TDs). Así, al aumentar la edad del

animal, disminuye el número de TEBs y aumenta el de los TDs, mientras que el número de ABs y lobulillos permanecerá estable o disminuirá discretamente hacia los 180 días de edad del animal (Figura 3).

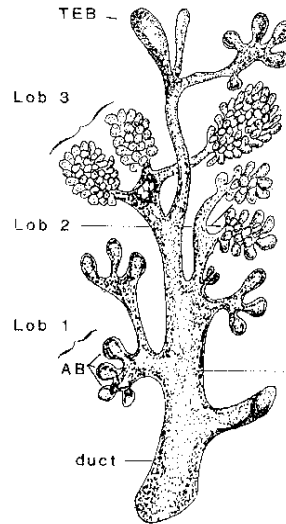


Figura 3. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria. Imagen de Russo&Russo [7671].

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

Se reconocen diferentes áreas topográficas en la mama de la rata que difieren en su morfología, características quinéticas, respuesta a estímulo hormonal y potencial carcinogénico ([3573]). Estas áreas resultan de dividir en tres tercios el parénquima mamario, a través del eje longitudinal (Figura 4). La zona A es la más próxima al pezón, constituida por ductos galactóforos principales y secundarios, la B es la intermedia, con ductos de menor tamaño y la C es la más alejada del pezón, rica en estructuras ductales terminales. Durante el proceso de maduración lobulilloalveolar se describe un gradiente de desarrollo mamario. Así, el número de TEBs disminuye marcadamente en las zonas A y B, en las que predominan los lobulillos y los ABs, respectivamente, pero no en la C, en la que predominan los TEBs y TDs, de crecimiento activo. Aunque todas las glándulas mamarias están constituidas por las tres

zonas descritas, la cantidad y el tamaño de cada una de ellas difieren según la localización anatómica. Así, las glándulas torácicas tienen más y mayores TEBs que las abdominales ya que muestran un enlentecimiento en la diferenciación ([3503]), el cual desaparece con la edad de manera que dichas glándulas terminan presentando el grado de desarrollo observado en el resto de localizaciones topográficas ([2952]).

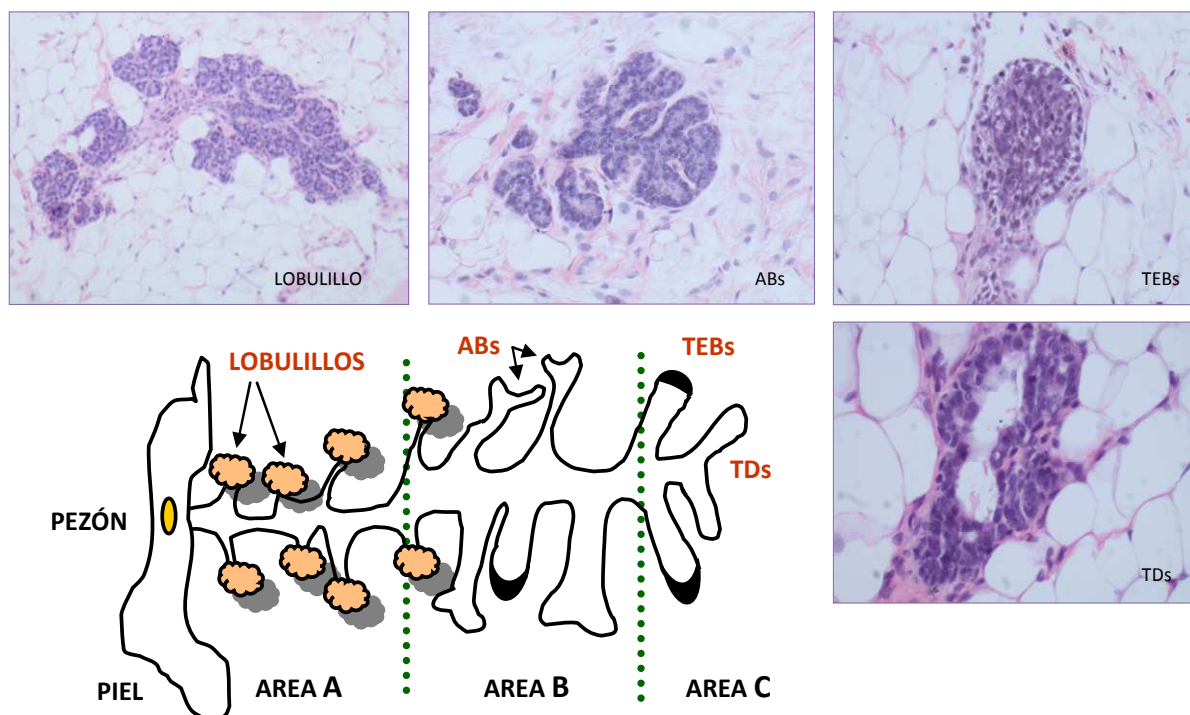


Figura 4. Topografía de la glándula mamaria de la rata

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

Una vez terminada la lactancia, la glándula mamaria padece una involución pero aún así, su arquitectura restará permanentemente modificada, de manera que presentará un gran

número de ABs y lobulillos. Se ha descrito que a los 40-42 días post-destete, las glándulas de una rata múltipara, en comparación con las de una rata nulípara, no tienen TEBs y ocasionalmente TDs. El número de ABs es similar, mientras que el de lobulillos es aproximadamente 4 veces mayor que el de una rata virgen adulta ([3165]).

B. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres en todo el mundo ([6691], [7519]) y el responsable de aproximadamente 1,67 millones de neoplasias diagnosticadas en 2012 (un 25% de todos los tipos de cáncer) ([8222]). Es, además, la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres, siendo responsable de 1 de cada 3 muertes por cáncer en el grupo de mujeres de edades entre 35 y 64 años ([3908], [4473], [4647], [7108]). Se ha detectado una tendencia al incremento de las tasas de mortalidad por cáncer de mama en el grupo de mujeres mayores de 50 años, con un descenso en las menores de 40 años, probablemente debido a la detección precoz y a los avances terapéuticos introducidos en las últimas décadas. Por otra parte, estudios epidemiológicos muestran variaciones geográficas importantes en la incidencia de dicho cáncer, siendo más elevada en países occidentales que en países en vías de desarrollo ([6093], [7108]) (Figura 5). A nivel mundial, las tasas brutas de incidencia de cáncer de mama más altas corresponden a la población blanca de Estados Unidos. Los registros poblacionales de Israel, Canadá y diversos países europeos están en la lista de las áreas de tasas de incidencia más elevadas, mientras que las más bajas se registran en África y Asia y en la población no judía de Israel.

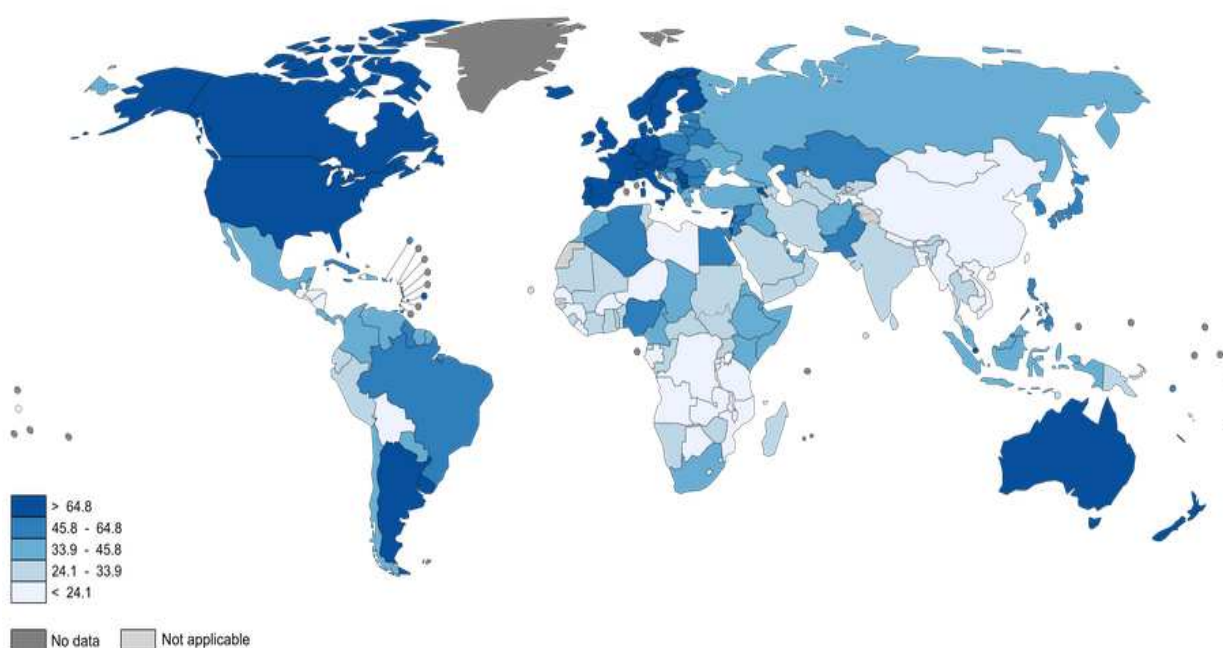


Figura 5. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres. Globocan, 2012 ([8222]).

En España la incidencia es más baja que en otros países de Europa, aunque se ha registrado un aumento del número de casos desde la década de 1980 hasta el año 2000 ([7672]). De hecho, según los últimos datos publicados, en España, el cáncer de mama es el que presenta mayor incidencia y mortalidad ([8222]). En relación a Cataluña, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años, aunque en el contexto europeo sigue siendo de los más bajos ([7673], [7674]).

Varios estudios demuestran, además, que la población emigrada de un país de origen a otro de adopción asume las tasas de incidencia y mortalidad del último en un período de una a dos generaciones ([6093], [6862]). Estos datos sugieren que el grado de desarrollo y/o industrialización, los factores ambientales y el estilo de vida están claramente involucrados en estas diferencias, tal como se comentará en el siguiente subapartado.

1. FACTORES IMPLICADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer representa un desorden del crecimiento celular, caracterizado por una proliferación incontrolada de las células de un determinado tejido, sin relación con las demandas fisiológicas del órgano del que forman parte y que, además, muestran capacidad de

invadir y destruir los tejidos adyacentes y diseminarse a distancia. El cáncer de mama, en concreto, es un proceso neoplásico de etiología multifactorial. Diversos factores, actuando de forma simultánea y/o secuencial, regulan las distintas etapas de la carcinogénesis mamaria. La naturaleza de estos factores es variada y se pueden clasificar en tres grupos: endocrinos, genéticos y epigenéticos, y ambientales. Estos factores no actúan aisladamente, sino que muestran una clara interdependencia entre ellos.

1.1. Factores endocrinos

La etiología y la progresión del cáncer de mama tienen un fuerte componente hormonal. Evidencias tales como que la nuliparidad, una primera gestación tardía, la menarquia precoz y la menopausia tardía se asocian a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama apoyan este papel hormonal ([3950], [3966], [5975]). Estudios experimentales muestran que los estrógenos, fundamentalmente 17β -estradiol (E_2) y estrona, y los andrógenos, a concentraciones fisiológicas, así como las dosis farmacológicas de progesterona, la insulina y la prolactina, estimulan la proliferación de las células tumorales mamarias. En cambio, los estrógenos y los andrógenos a dosis farmacológicas y las dosis fisiológicas de progesterona son inhibidores. El efecto bifásico de los estrógenos podría estar mediado por la acción de la prolactina, estimulada por niveles bajos de estrógenos e inhibida por dosis elevadas. En mujeres obesas y postmenopáusicas, la conversión en el tejido adiposo de los andrógenos suprarrenales a estrógenos, por una aromatasas, explicaría, entre otros, el mayor riesgo de padecer cáncer de mama en estas mujeres ([4595]). Además, se ha observado que el embarazo ejerce un efecto protector si precede a la transformación de la glándula mamaria y un efecto estimulador si es posterior. El efecto protector del embarazo, así como el de la hormona gonadotropina coriónica humana, está relacionado con la diferenciación de la glándula mamaria asociada con la depresión de la proliferación celular y la síntesis de inhibina por las células epiteliales ([1718], [2406], [3370]). Aunque clásicamente se ha considerado que los estrógenos ejercían un papel fundamentalmente promotor de la carcinogénesis mamaria, algunos trabajos experimentales indican que también podrían intervenir en la iniciación, actuando como cocarcinógenos, potenciando o facilitando la acción del agente carcinogénico ([2363], [3321], [3326], [4505]). En este sentido, se ha descrito un aumento en la tasa de proliferación por acción de los estrógenos, de manera que estas hormonas pueden aumentar la proliferación de células susceptibles a carcinógenos, o pueden promover que un clon de

células iniciadas se desarrolle en un tumor detectable. Además, se ha demostrado que los estrógenos son agentes genotóxicos directamente a través de sus metabolitos y/o, indirectamente, mediante la síntesis de especies reactivas de oxígeno (“reactive oxygen species” ROS), que pueden producir daño oxidativo en las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas, ADN) ([4680]).

La determinación de los receptores esteroideos ha permitido clasificar los tumores mamarios, según su contenido en receptores de estrógenos (RE) y/o de progesterona (RP), en hormonodependientes (RE+RP+, RE+ RP- y RE- RP+) y hormonoindependientes (RE-RP-). La mayoría de los tumores mamarios experimentales presentan uno o ambos tipos de receptores y su contenido medio es mayor cuanto menor es la dosis del carcinógeno ([798], [1678]). En el cáncer de mama humano esta clasificación ha resultado de gran utilidad, puesto que permite seleccionar a las pacientes candidatas a terapia hormonal, reconocer a aquellas con mayor riesgo de recurrencia y asociar el estado de receptores de estradiol con una serie de características: los tumores RE⁺ suelen observarse en pacientes de mayor edad y ser de menor tamaño, histológicamente más diferenciados y con pequeño porcentaje de células en fase S ([113], [1870], [2643]). Al menos un 70% de las pacientes con cáncer de mama son clasificadas como RE⁺, por lo que el tratamiento más aplicado es el de interferir en la actividad estrogénica ([7062]). Su contenido es variable según el tipo de carcinoma, siendo más elevado en los carcinomas lobulillares y muy bajo o nulo en los carcinomas medulares e inflamatorios ([113]). Existen dos tipos de RE en la mayoría de los vertebrados, el RE_α y el RE_β, este último con cinco isoformas de las que destacan RE_{β1} y RE_{β2}, que presentan una elevada homología pero diferentes propiedades de unión al ADN y al ligando, así como un patrón de expresión celular y tisular ligeramente distinto, lo que indica que probablemente estén implicados en distintos procesos biológicos ([3403], [3405], [5817], [6813]). Así, RE_α es un activador transcripcional mucho más potente que RE_β y es considerado el marcador predictivo de la respuesta a una terapia antiestrogénica. La implicación del RE_β en cáncer de mama no está clara, pero podría antagonizar los efectos del RE_α al heterodimerizar con éste ([5685], [6801], [6806]). Cabe señalar, no obstante, que en ausencia de RE_α, RE_β media, parcialmente, los efectos de los estrógenos sobre la transcripción de genes ([5782]). La acción de la progesterona está mediada por RP, del que se han descrito dos isoformas, RP-A y RP-B, codificadas por un mismo gen a partir de promotores diferentes. En la mayoría de los contextos celulares, RP-B es un activador de la transcripción génica muy potente, mientras

que RP-A puede actuar como un represor *trans* de RP-B y de otros receptores esteroideos, como RE, o formando heterodímeros ([5685]).

En relación con el cáncer, el RE α se encuentra implicado en la iniciación y progresión en cáncer de mama, siendo el principal mediador endógeno de la acción rápida de E $_2$ dirigida hacia la proliferación celular, mientras que el papel de RE β en el efecto proliferativo de E $_2$ no es bien conocido ([5782]) y se postula un posible papel supresor, modulando los efectos de RE α al heterodimerizar con éste, ejerciendo un papel protector contra el desarrollo del cáncer ([4505], [5659], [5895]). Estudios en humanos han detectado un aumento de RE α en la transición de tejido normal a maligno, mientras que los niveles de RE β disminuyen durante la progresión del cáncer de mama ([6845]). En relación a la progesterona, elevadas cantidades de esta hormona, en combinación con el estradiol, tienen una actividad proliferativa importante en glándula mamaria adulta de roedores y humanos, mediada por RP ([5655], [6818]). Aun así, en general, la síntesis de RP, así como la mayor prevalencia de RP-B, son de buen pronóstico, mientras que la pérdida de RP o una elevada penetrancia de RP-A indican mayor agresividad tumoral y mayor probabilidad de metástasis ([5660], [6812]).

Sin embargo, la determinación de los receptores no es suficiente para discernir la hormonodependencia funcional, como lo demuestra el hecho de que entre un 20 y un 30% de los tumores con receptores no responden a la terapia, o desarrollan resistencia durante la realización de la misma. Se han propuesto diferentes situaciones para explicar la resistencia al tratamiento antiestrogénico: la heterogeneidad celular tumoral que explicaría el desarrollo de una población de células hormonoindependientes, las alteraciones genéticas y epigenéticas del gen del RE, las anomalías postreceptor en la cascada de respuesta hormonal, las alteraciones en la transcripción o mutaciones de los genes de los factores de crecimiento y protooncogenes o a la presencia de interacciones anómalas autocrinas o paracrinas de las células RE negativas adyacentes, entre otras ([3326], [3405]). Por otro lado, el hallazgo de la forma β del RE permite considerar que algunos tumores RE α negativos pueden ser RE β positivos, y beneficiarse del tratamiento hormonal ([3965]).

La regulación del crecimiento de los tumores mamarios hormonodependientes es compleja. Por una parte, son diversas las hormonas que regulan la producción de receptores esteroideos. Por otra parte, los estrógenos controlan la expresión de diversos genes que participan en el ciclo celular, la regulación de la sensibilidad de las células tumorales a hormonas y factores de crecimiento y la producción de estos últimos ([1870], [2393], [3965]). En este sentido, los esteroides, tras la unión a sus receptores intracelulares específicos y mediante la unión a secuencias reguladoras del ADN (“steroid response elements” -SRE- y “steroid response

units” –SRU-), regulan de forma rápida la expresión, entre otros, de los protooncogenes nucleares c-fos, c-jun y c-myc, implicados en el crecimiento y la diferenciación celular. Los productos de estos genes de respuesta rápida (“early genes”) son proteínas de unión al ADN (factores de transcripción) que, a su vez, controlan la expresión de genes de respuesta tardía (“late genes”) que codifican para proteínas estructurales. Los receptores esteroideos activados también pueden actuar directamente sobre éstos últimos en conjunción con el producto de los “early genes”. Además, se ha descrito un mecanismo de acción independiente de estrógenos en el que otros estímulos pueden activar el receptor, como factores de crecimiento, neurotransmisores y moléculas de señalización ([5672]). Finalmente, algunos de los efectos inmediatos producidos por los estrógenos en algunas células podrían ser iniciados por la unión a RE asociados a membrana (mSR), encontrados en las caveolas de la membrana ([5889]). Estos RE, unidos a los a E₂, activan proteínas G iniciando así múltiples vías de transducción de señales ([5892]). Se ha sugerido una función como agentes “centinela” de la respuesta hormonal, iniciando rápidamente una respuesta que prepara a la célula para decidir si está en condiciones de iniciar la síntesis de ARNm y proteínas en respuesta a estas hormonas ([4716], [4718], [4719]). La acción de los esteroides es específica del tejido y/o del tipo celular y requiere la participación de otras proteínas nucleares reguladoras (no histonas), que modifican el estado de la cromatina, reúnen la maquinaria transcripcional y facilitan la transcripción de los genes ([2349], [2645], [3403], [5673]).

Las bases moleculares del comportamiento de los tumores hormonoindependientes no están tan bien determinadas. Las líneas celulares hormonoinsensibles secretan grandes cantidades de factores de crecimiento, en ausencia de estrógenos, que no se alteran al añadir dichas hormonas. Estudios “in vitro” sugieren la posibilidad de que la activación de determinados oncogenes podría ser responsable de la regulación positiva de los factores de crecimiento, sobrepasando totalmente el papel regulador de los estrógenos. En definitiva, en el tumor hormono dependiente existen bajas concentraciones de factores de crecimiento que son regulables por diversos factores. En cambio, las células de los tumores hormono independientes presentan elevados niveles de dichos polipéptidos, constitutivamente aumentados ([1870], [1948], [2501]).

Finalmente, debe considerarse el papel de las hormonas exógenas en el cáncer de mama, en particular el de las fuentes exógenas de estrógenos, conocidos como xenoestrógenos o disruptores endocrinos, que al ser ingeridos o absorbidos alteran la homeostasis del sistema endocrino ([7681]).

1.2. Factores genéticos y epigenéticos

Los procesos celulares de proliferación, diferenciación y muerte celular son esenciales para la formación, el mantenimiento de la función y los fenómenos de reparación de todos los tejidos y órganos del organismo. En condiciones normales, estos procesos están estrictamente regulados por señales que provienen del medio interno o externo, que aseguran la homeostasis tisular y de los órganos. Los genes involucrados en esta regulación son principalmente protooncogenes, genes supresores, genes del ciclo celular, genes reparadores del ADN o genes reguladores de la apoptosis. Las alteraciones estructurales de estos genes (mecanismos genéticos), así como una gran variedad de mecanismos que pueden influenciar el comportamiento, que no la estructura, del ADN (mecanismos epigenéticos) constituyen la base de los mecanismos moleculares del cáncer ([2439], [7688]).

La carcinogénesis es un proceso altamente complejo que resulta, principalmente, de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, entre las que se halla la inactivación de genes supresores y la activación de protooncogenes, de forma secuencial y simultánea ([2444], [3973], [7688]). Las proteínas codificadas por los protooncogenes son componentes de las vías de transducción de señales mitogénicas: factores de crecimiento (como PDGF β /v-sis), receptores de membrana de factores de crecimiento (como EGFR/v-ErbB), proteínas citoplasmáticas transductoras de señales (como la familia de GTPasas, que incluye c-Ha-ras) y factores de transcripción (como c-myc, c-fos y c-jun) ([1576], [1881]). Estos genes pueden transformarse en oncogenes mediante activación, con una ganancia de función permanente, lejos de cualquier tipo de control ([1975], [2393], [4202]). Dicho proceso puede producirse por distintos mecanismos genéticos (como amplificaciones) o epigenéticos ([2390], [3408], [7022]), mientras que otro tipo de alteraciones como las mutaciones puntuales y las translocaciones específicas son menos frecuentes en cáncer de mama ([1948]). Los oncogenes participan en las diferentes etapas de la carcinogénesis, siendo necesaria la cooperación entre varios de ellos para conducir a las células a la inmortalización y transformación tumorigénica ([1975], [2393], [4202]). En cambio, los genes supresores codifican proteínas que controlan el ciclo celular inhibiendo la proliferación, inducen a las células a la diferenciación terminal, participan en la reparación de las lesiones del ADN y/o inducen la muerte celular programada o apoptosis cuando las lesiones del ADN son serias. Entre ellos, se reconocen p53, Rb, BRCA1, BRCA2 y el gen de la poliposis adenomatosa cólica APC. Las alteraciones de estos genes comportan pérdida de función, facilitando la formación de tumores al liberar a las células de las restricciones normales para proliferar, de

la posibilidad de reparar el ADN y de inducir la apoptosis ([2846]). Entre estas alteraciones destacan a nivel genético fundamentalmente las mutaciones puntuales y deleciones de la región cromosómica que los contiene, y a nivel epigenético la represión transcripcional ([1948], [7022]). Mientras que las alteraciones que conllevan la activación de protooncogenes son dominantes, la inactivación de los genes supresores es normalmente recesiva y requiere una nulicigosidad funcional o ausencia de la proteína normal ([2493], [2606]).

Otros genes involucrados en la carcinogénesis son los que intervienen en la regulación del ciclo celular y que codifican diferentes ciclinas y quinasas ciclina-dependientes (CDK), así como los que codifican las proteínas reparadoras del ADN, como los genes “mismatch repair” o MMR (MSH2, MHL1, PMS2 y MSH6), los genes “nucleotide-excision repair” o NER (como XPA-XPG) y los genes “base-excision repair” o BER. Las mutaciones y la inactivación de estos genes, conocidos como genes “caretaker” o de estabilidad, permiten la acumulación de mutaciones espontáneas e inducidas en otros genes, lo que conlleva a una inestabilidad genética y contribuye al desarrollo cancerígeno. Por otro lado, la desregulación de la apoptosis o muerte celular programada también está ligada al desarrollo cancerígeno. La apoptosis elimina las células no necesarias y alteradas, evitando la acumulación secuencial de daños genéticos en las células y la consecuente transformación maligna. En este proceso intervienen, entre otros factores, las caspasas y la familia de proteínas Bcl-2, que comprende miembros pro-apoptóticos como Bax y Bad, y miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL ([3371], [3957], [4093]), así como algunos genes supresores, como p53 o algunos oncogenes (myc, rho y E1A de adenovirus) ([2602], [2875]).

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

crecimiento (como PDGF y TGF α), de presentar alteraciones de la expresión o activación de receptores para dichos factores (como EGFR y ErbB2/HER2) o de algunos componentes de la vía de señalización intracelular mitogénica (proteínas Ras estructuralmente alteradas que generan un flujo de señales mitogénicas hacia la célula sin necesidad de estimulación de sus reguladores “upstream”) ([1576], [1881], [3973], [5484]). La célula tumoral también puede evadirse de las señales antiproliferativas, como por ejemplo mediante la proteína Rb (retinoblastoma) fosforilada (pRb), p107 y p130 ([3973]). Pero, además, es necesaria una desregulación de la apoptosis que junto con un aumento de la tasa de proliferación celular serían los fenómenos responsables de crear un “escenario” suficiente para el desarrollo del cáncer ([4061], [5576]). Asimismo, para que el crecimiento sea ilimitado es necesaria la inmortalización o evasión de la senescencia, a través de la incapacitación de proteínas supresoras de tumores como pRb y p53, y el mantenimiento de los telómeros ([3973]). De hecho, las mutaciones en el gen p53 representan uno de los cambios genéticos más comunes identificados en el cáncer de mama ([3144], [4061], [4595], [5576], [7683]). Por otro lado, la célula tumoral se caracteriza por una tasa de mutabilidad elevada, por el aumento de la sensibilidad a agentes mutagénicos o mediante la alteración de los mecanismos reparadores del genoma, confiriendo así inestabilidad genómica. La pérdida del ADN telomérico en los tumores también genera una situación de inestabilidad genómica, en la que se producen amplificaciones y deleciones de segmentos cromosómicos. Los defectos en el mantenimiento del genoma y la reparación confieren ventajas selectivas y, por lo tanto, útiles para la progresión tumoral ([7349], [7682]).

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

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

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

Tal y como se ha comentado, las alteraciones de los tipos de genes mencionados constituyen la base de la transformación neoplásica, permitiendo la adquisición de las capacidades de la célula tumoral. La acumulación de mutaciones ha sido considerada clásicamente el mecanismo de alteración de estos genes. Sin embargo, este paradigma ha sido extendido para incluir la disrupción epigenética como uno de los mecanismos principales de transformación maligna, tal y como será detallado en el apartado E de la Introducción.

Finalmente, la aparición de cáncer en la población general puede explicarse por una susceptibilidad genética y/o por alteraciones (genéticas y epigenéticas) somáticas adquiridas. Existen dos grupos de genes relacionados con la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Por un lado, están los genes de baja penetrancia, que muestran elevada frecuencia de variantes alélicas asociadas a enfermedad y que confieren un bajo riesgo de desarrollar cáncer. En estos casos, el cáncer de mama aparece en ausencia de una historia familiar clara de dicha neoplasia, habitualmente en épocas avanzadas de la vida y probablemente por interacción con otros factores genéticos y/o ambientales. En este grupo se incluyen genes que codifican enzimas con actividades bioquímicas o fisiológicas relacionados con la patobiología del cáncer de mama, como los involucrados en el metabolismo de carcinógenos (los genes de las glutation-s-transferasas -GSTM1, GSTP1 y GSTT1-, los miembros de la familia de los genes del citocromo P450 o de la N-acetiltransferasa), los que intervienen en la reparación del ADN o en el metabolismo de los lípidos o de las hormonas, y algunos protooncogenes como el H-ras1 ([3557]). Por otro lado, están los genes cuyas variantes alélicas comportan un alto riesgo de desarrollar la neoplasia en el individuo portador (genes de alta penetrancia), pero que se hallan con rareza en la población general y que crean un patrón de herencia mendeliana del cáncer. Suelen asociarse con cánceres de distintas localizaciones y aparecer en edades

tempranas. Dentro de este grupo se encuentran los genes BRCA1 -“Breast Cancer 1”- y BRCA2 -“Breast Cancer 2”, asociados al cáncer de mama y ovario ([2522], [2586], [7687]). Las mutaciones de estos genes, cuando afectan a la célula germinal, pueden transmitirse al recién nacido, si se hereda el alelo mutado, y conferir un riesgo elevado de padecer cáncer. Esta situación es la que se observa en el cáncer de mama hereditario que representa el 5-10% del total de cánceres mamarios ([3127], [4534]). La mutación de BRCA1 en la línea germinal se ha identificado en el 15-20% de pacientes con historia familiar de cáncer de mama y en el 60-80% con historia familiar de cáncer de mama y ovario. El gen BRCA1 codifica una proteína nuclear que funciona como un coactivador transcripcional de genes involucrados en el ciclo celular y de respuesta al daño en el ADN. Células sin BRCA1 funcional no se paran en G₂ después de un daño en el ADN y son deficientes en la reparación acoplada a la transcripción ([4534], [4623]). En general, las mutaciones de pérdida de función de BRCA1 confieren un riesgo del 83% de desarrollar cáncer de mama y del 63% de cáncer de ovario antes de los 70 años ([2586], [2845]). Las mutaciones en BRCA2 se asocian con un elevado riesgo de cáncer mamario en hombres ([2586], [7687]). El gen BRCA2 codifica una proteína nuclear que también estaría involucrada en el mantenimiento de la integridad cromosómica, así como en la segregación de los cromosomas ([4534], [4595], [4623]). Tanto BRCA1 como BRCA2 están involucradas en la reparación mediada por recombinación de las roturas de ADN de doble cadena ([4534], [4623]). Se han identificado distintas mutaciones del gen, como la introducción de un codón “stop” prematuro (mutaciones “nonsense”), la inserción o delección de pequeñas secuencias que resultan en mutaciones que cambian la pauta de lectura (“frameshift”) y, ocasionalmente, mutaciones que provocan la substitución de un aminoácido por otro (“missense”) ([2522], [2844], [2845]). Se observa variabilidad interindividual entre los portadores de mutaciones de ambos genes, tanto en lo que se refiere a edad de aparición como a localización del cáncer, probablemente por el diferente riesgo que comportarían distintas mutaciones del mismo gen, o por el papel de otros factores que podrían modificar el riesgo de cáncer de una determinada mutación, como otros genes involucrados en el metabolismo hormonal o del carcinógeno, características individuales como la historia reproductiva y factores exógenos como el uso de anticonceptivos orales o el tabaco, entre otros motivos. Aproximadamente, el 52% de los cánceres de mama hereditarios se explican por mutaciones en el gen BRCA1 y el 32% en BRCA2, por lo que se cree que en el futuro se aislarán nuevos genes relacionados con esta patología ([4534], [4623]).

1.3. Factores ambientales

Las variaciones geográficas en la incidencia y la mortalidad del cáncer sugieren que, además de los factores endocrinos y genéticos, deben existir otros factores de tipo ambiental y de estilo de vida implicados en su etiología ([3874], [4349], [4350], [4539], [4647]) (Figura 5). Algunos productos naturales e industriales, factores físicos, organismos biológicos y ciertos hábitos dietéticos y/o tóxicos (tabaco, alcohol,...) han sido descritos como agentes con actividad iniciadora y/o promotora de la carcinogénesis ([1659]). De todos ellos, los de tipo nutricional (descritos en el apartado C de la Introducción) tienen gran trascendencia por la continua exposición a la que está sometida la población por sus hábitos alimentarios. Así, se ha observado una estrecha correlación entre nutrición y cáncer colorectal, de mama, endometrial y de próstata ([860], [868], [1660], [1959], [4349], [5321]). En este sentido, se han observado asociaciones que pueden ser positivas como en el caso de las grasas, los carbohidratos, las proteínas y el aporte calórico, y otras negativas, como en el caso de la fibra, algunas vitaminas (folato, riboflavina, vitamina B12, etc.), licopeno, lignanos, isoflavonas, minerales (zinc, magnesio, calcio) y otras sustancias, la restricción calórica y cantidades moderadas de vino y cerveza ([7677]).

Entre los nutrientes que juegan un papel en la relación cáncer y nutrición destacan los lípidos de la dieta y una de las asociaciones más estudiadas ha sido con el cáncer de mama. Desde que en 1942 Tannenbaum ([1663]) demostró que la incidencia de cáncer mamario espontáneo era más elevada en ratones alimentados con una dieta suplementada con grasas, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales han puesto de manifiesto la relación existente entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama ([1700], [1829], [2608], [2642]). En el caso de los estudios ecológicos por países, se ha hallado una asociación positiva entre el consumo de grasa per capita y las tasas de mortalidad por cáncer de mama. En estos estudios, los países con Dieta Mediterránea presentan valores intermedios para este cáncer. De la misma manera, los estudios de migración de poblaciones muestran que las poblaciones que migran entre áreas con distintas incidencias de cáncer de mama, tras una o dos generaciones, adquieren las tasas de mortalidad propias del país de destino. En cambio, en los estudios epidemiológicos analíticos, caso-control y prospectivos de cohortes, la relación no es tan clara. La agrupación de varios de ellos, mediante técnicas de metanálisis, ha permitido reanalizar los datos con mayor consistencia y, en algunos casos, la relación entre lípidos de la dieta y cáncer de mama ha quedado manifiesta ([868], [1660], [3840], [7692]). Además, recientemente, el proyecto EPIC (“European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition”) ha mostrado que la ingesta

elevada de grasas, independientemente del tipo, está asociada con elevado riesgo de cáncer de mama ([6321]). El diferente efecto de los distintos tipos de lípidos así como los mecanismos por los cuales modulan la carcinogénesis serán ampliamente descritos en el apartado D de este capítulo.

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

2. PATOGENÉISIS DEL CÁNCER DE MAMA

2.1. Cáncer de mama humano

El lobulillo tipo 1 o TDLU es la estructura donde se inicia el carcinoma ductal convencional de mama. Además de las evidencias descritas en humanos, estudios “in vitro” demuestran que la transformación neoplásica de células en cultivo, obtenidas de las distintas estructuras anatómicas de la mama humana, expuestas a carcinógenos, únicamente se observa en las células epiteliales de tejidos mamarios ricos en lobulillos 1 y 2 ([3165]). El lobulillo tipo 3 daría lugar a lesiones benignas como los fibroadenomas o hiperplasias lobulillares y ductales usuales, mientras que los adenomas lactantes nacerían de los lobulillos tipo 4 y el papiloma intraductal, de ductos extralobulillares cercanos al pezón ([3165], [3503], [3966]).

Como se ha comentado previamente en el apartado A.1 de la Introducción, el lobulillo 1 es la estructura predominante en la glándula mamaria en mujeres nulíparas de cualquier edad, mientras que el tipo 3 es el más abundante en la mujer múltipara. Estudios epidemiológicos señalan que el periodo existente entre la menarquia y el primer embarazo a término, la etapa más rica en lobulillos tipo 1, es el de máxima susceptibilidad para el inicio del cáncer de mama. La protección contra el cáncer de mama atribuida a la gestación, en concreto cuando ocurre antes de los 24 años de edad, se debe, entre otros factores, al aumento del compartimento lobulillar maduro, mientras que la menarquia precoz, la nuliparidad o el primer embarazo en edades más avanzadas son factores de riesgo reconocidos para desarrollar cáncer de mama, ya que comportan una diferenciación tardía o insuficiente de la glándula mamaria y una ampliación del periodo de máxima susceptibilidad ([3165]). La presencia de

lobulillos tipo 1 en la mama de las mujeres menopáusicas explicaría el desarrollo de neoplasia en mujeres mayores, aunque la transformación maligna podría haber ocurrido previamente y que el tumor se manifieste clínicamente en edad más avanzada.

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea que incluye una amplia variedad de entidades que exhiben comportamientos clínicos diversos. Recientemente, se ha comprobado que estas entidades están definidas a nivel molecular por determinadas alteraciones genéticas que afectan procesos celulares y que han permitido entender mejor el desarrollo y la evolución de las neoplasias de mama ([7263], [7264]). Se reconocen distintas vías patogénicas que llevan al carcinoma invasor ([7260]). Así, parece existir una rama para los carcinomas de bajo grado, que incluye el carcinoma ductal infiltrante bien diferenciado, el carcinoma tubular, el carcinoma lobulillar infiltrante clásico, y en la que lesiones como la atipia del epitelio plano, la hiperplasia ductal y lobulillar atípicas, el carcinoma intraductal de bajo grado y el carcinoma lobulillar “in situ” comparten anomalías moleculares. Concretamente, estas entidades se caracterizan por presentar expresión de receptores hormonales, pocas alteraciones cromosómicas, a excepción de pérdidas recurrentes de 16q, y ausencia de expresión de citoqueratinas basales (CK5/6) o de sobreexpresión de HER2, lo que sugiere que forman parte de la vía de progresión de estos cánceres [7423]. Por otro lado, la rama de los carcinomas de alto grado, que incluye a los carcinomas ductales infiltrantes pobremente diferenciados, tanto aquellos que se caracterizan por sobreexpresar HER2, como los que exhiben citoqueratinas basales, se caracterizan por mostrar genotipos muy complejos, con ganancias y pérdidas de material de muchos cromosomas y amplificaciones de genes. Las lesiones precursoras en este grupo, aunque no están bien definidas, no incluyen las anteriormente descritas en la rama de bajo grado y parecen corresponder a hiperplasias apocrinas atípicas y a adenosis microglandulares ([7258], [7259]). Existen una serie de carcinomas de características moleculares intermedias, como el carcinoma lobulillar pleomórfico y el carcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado, en los que las vías de progresión son menos evidentes. Asimismo, los cambios genéticos observados en las lesiones proliferativas benignas son raros y diferentes a los descritos en el carcinomas. En cuanto a la célula de origen, la carcinogénesis mamaria recapitula los estadios de diferenciación de la célula epitelial normal, de tal manera que la mayoría de los carcinomas de mama derivan de la célula luminal diferenciada, que expresa CK8/18/19, posiblemente a través de eventos mutacionales que pueden haber ocurrido en etapas previas en la línea diferenciación glandular, mientras que una pequeña proporción (5-10%) deriva de la célula progenitora que expresa citoqueratinas basales (CK5/6) o de una célula intermedia, CK5/6 y

CK8/18/19 positiva. Finalmente, las células que integran la línea mioepitelial, y que coexpresan marcadores de músculo liso, serían el origen de las lesiones mioepiteliales de mama, como el carcinoma adenoide-quístico o el adenomioepitelioma ([7257]). Estudios moleculares adicionales han ampliado y clarificado estas vías de progresión del cáncer de mama, así como el papel de las células progenitoras “stem” como precursoras y como verdaderas dianas terapéuticas en los tumores más agresivos ([7423], [7614], [7615]).

Finalmente, los hallazgos moleculares de estudios de expresión génica, de hibridación genómica comparativa o de secuenciación genética, junto con los conocimientos morfológicos previos, han reconocido 4 grupos perfilados: 1) luminar A, con expresión de receptores de estrógenos y CK8/18, que histológicamente suelen ser de bajo grado y que responden a hormonoterapia); 2) luminar B, con expresión de receptores de estrógenos pero en niveles más bajos, que característicamente muestran expresión de genes relacionados con la proliferación celular, con expresión elevada de Ki67 en el estudio inmunohistoquímico, y expresión de CK8/18; y que histológicamente son de mayor grado, menos hormonosensibles y con peor pronóstico que el luminar A. Por otro lado, se encontrarían los grupos RE⁻ negativos, descritos en carcinomas histológicamente mal diferenciados: 3) basal-“like”, con ausencia de sobreexpresión de HER2, con expresión de CK5/6 y 14, que responden a quimioterapia con antraciclinas y taxanos, y 4) HER2+, con amplificación y sobreexpresión de c-Erb-B2, y que responden, además de a quimioterapia, a trastuzumab. Los tumores RE⁻ tienen peor pronóstico que los grupos RE⁺, probablemente por su alto riesgo de recaída temprana. Además, se han descrito nuevos grupos moleculares, como el apocrino (receptores de andrógenos positivos y RE⁻) y el Claudin-“low”.

2.2. Cáncer de mama experimental

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

Los TEBs y los TDs son la estructura diana del carcinógeno y origen de los carcinomas mamarios experimentales de rata ([1520], [1524]). Estudios realizados por Russo y colaboradores constatan que a los 14 días de administración del carcinógeno, los TEBs, en

lugar de diferenciarse normalmente a ABs o involucionar a TDs, crecen y se agrandan al proliferar las células epiteliales luminares, constituyendo las proliferaciones intraductales (IDPs) ([995], [3966]). Se reconocen dos tipos de IDPs: los [i] o iniciados, que no despiertan reacción estromal ni se modifican durante el resto del experimento y los [i+p] o iniciados y promocionados, que despiertan reacción estromal con depósito de colágeno e infiltración por linfocitos y mastocitos. Aunque a los pocos días de la inducción con DMBA se observan numerosos IDPs que aumentan con el tiempo (de 10 a 20 por glándula mamaria a las tres semanas hasta 30 a los 200 días), solamente los IDPs [i+p] progresarán a adenocarcinomas. Concretamente, a los 20 días, se evidencian pequeños microtumores, secundarios a la coalescencia de IDPs [i+p], que corresponden a carcinomas intraductales, con células epiteliales que muestran pleomorfismo y aumento del tamaño nuclear y moderada actividad mitótica. De estas estructuras microscópicas se desarrollan los tumores palpables, constituyendo carcinomas infiltrantes. Si el animal vive el suficiente tiempo, aparecerán metástasis, especialmente en pulmones ([2952], [3122], [3966]). Se observan un mayor número de adenocarcinomas mamarios en la región torácica que en la abdominal e inguinal, lo que parece estar relacionado con el mayor número de TEBs durante un mayor periodo de tiempo en las glándulas de dicha localización ([3503], [3966]), tal como se ha comentado anteriormente en el apartado A.2. En cuanto a la célula diana del carcinógeno, diversos estudios sobre los compartimentos celulares de la glándula mamaria señalan a la célula denominada intermedia ([7520]). En este sentido, en la carcinogénesis experimental se observa una disminución de la proporción de células denominadas “dark” y un aumento del porcentaje de células intermedias en los TEBs y los TDs, a las pocas horas de la administración de DMBA, cambios que no se manifiestan en los ABs ni en los lobulillos. Cuando los tumores se hacen palpables (aproximadamente a los 40 días postadministración de DMBA), las células intermedias constituyen el 65% de la población celular y en los tumores de 100 días de edad las células intermedias alcanzan el 90% del total. Además, las tasas de proliferación de cada uno de los tipos celulares son distintas según la estructura anatómica en la que se hallan. Así, en los TEBs, las células intermedias tienen un ciclo celular más corto y un índice de marcaje de ADN mayor que las mismas células de los ABs. Esta diferencia apoya la mayor susceptibilidad de la célula intermedia de los TEBs al carcinógeno ([2952]). Las lesiones benignas (quistes, adenomas, hiperplasias lobulillares y fibroadenomas) se originan de los ABs. Además, las lesiones benignas tienden a aparecer más tarde que las malignas, a las 5 o 6 semanas postadministración del carcinógeno, lo que indica que las lesiones benignas no son precursoras de las malignas.

C. ESTILO DE VIDA Y CÁNCER DE MAMA

1. FACTORES NUTRICIONALES

Existen numerosos factores ambientales, tanto nutricionales como de estilo de vida, relacionados con la prevención y el desarrollo de diversas neoplasias. De todos los componentes de la dieta que han estado relacionados con el cáncer de mama, los lípidos son los más relevantes. En este sentido, los estudios epidemiológicos no han mostrado siempre resultados concluyentes ([6093]), aunque análisis prospectivos han determinado que la ingesta elevada de grasas, independientemente del tipo, está asociada a un elevado riesgo de cáncer de mama ([6321]). Estos estudios tienen ciertas limitaciones ya que no consideran otras características que pueden diferir entre distintas poblaciones y que pueden contribuir al desarrollo de cáncer de mama, y la mayoría de ellos no discriminan los efectos independientes producidos por factores asociados, como es la concentración y el tipo de grasas, el aporte calórico, etc. ([2045], [2608]). En cambio, los estudios experimentales han mostrado claramente un efecto de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama. Dicho efecto depende del tipo y de la cantidad de grasa ingerida, así como del hecho de su presencia en ciertas fases críticas de la carcinogénesis y del estado de diferenciación de la glándula mamaria ([3338], [5816], [7145]). Más allá del contenido lipídico total, existe un efecto específico de las distintas grasas de la dieta. Así, dietas con una misma cantidad de energía y contenido graso total difieren en su capacidad estimuladora, según su composición en ácidos grasos ([1829], [2289], [4540]). Parece existir un requerimiento mínimo de ácidos grasos poliinsaturados a partir del cual el efecto de la grasa dependería de la cantidad total de lípidos de la dieta. Concretamente, por encima del 4-5% de ácidos grasos poliinsaturados, respecto al total de calorías, el rendimiento de la carcinogénesis inducida con dimetilbenz(α)antraceno (DMBA) se incrementa proporcionalmente a la cantidad de grasa total de la dieta ([2045], [3568]). Una cuestión aún en debate es la que concierne al efecto de las calorías como uno de los causantes de la capacidad de los lípidos de la dieta a estimular la tumorigénesis mamaria. Los estudios epidemiológicos han demostrado una asociación positiva entre el aporte calórico de las dietas y las tasas de mortalidad por cáncer de mama, lo que coincide con los resultados experimentales en los que se observan que las dietas hipercalóricas estimulan el desarrollo tumoral ([868], [920]). A pesar de que algunos autores no encuentran a las dietas hiperlipídicas hipocalóricas promotoras de la carcinogénesis mamaria ([1973]), el hecho de que sólo ciertos tipos de tumores se estimulen por las dietas ricas en grasas y de que en el

cáncer de mama se haya demostrado una distinta eficacia de los diferentes tipos de lípidos, a pesar de proporcionar un aporte calórico equivalente, indica que existe también un mecanismo de acción específico de las grasas e independiente del aporte calórico ([1700], [1962]). Por contra, la restricción calórica tiene un efecto inhibitorio indiscriminado sobre la carcinogénesis, lo que sugiere que el mecanismo de acción de las calorías es inespecífico ([868], [3673]).

En general, los PUFA de la familia n-6, fundamentalmente el ácido linoleico (18:2n-6), presentes en aceites vegetales, son los principales estimuladores de la carcinogénesis experimental ([1358], [3568], [3672], [4324]). Es de destacar el ácido γ -linolénico (18:3n-6) que supone una excepción dentro de esta familia, ya que posee propiedades antiproliferativas ([3980], [3982]). Además, el ácido linoleico conjugado (CLA), término en el que se engloban diversos isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, y que está presente en la carne y en los productos lácteos derivados de rumiantes, podría tener un efecto inhibidor del cáncer de mama ([2949], [3205]). Además, éste presenta propiedades antidiabéticas, anticancerígenas y antioxidantes ([4538], [4543]). Por otro lado, los PUFA de la familia n-3, fundamentalmente el ácido α -linolénico (18:3n-3), y los de cadena larga, de origen marino, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), serían inhibidores del crecimiento tumoral mamario y la metástasis ([1486], [3568], [3615], [4324], [4353]). En cuanto a las grasas saturadas de procedencia animal, y los lípidos insaturados *trans*, que se originan tras los procesos de manufacturación de varios productos de aceites vegetales, también son promotores, pero menos potentes que las grasas polinsaturadas de origen vegetal, y además, podrían actuar como co-carcinógenos durante la iniciación. Los lípidos insaturados *trans* se comportarían como los saturados en cuanto a la promoción de la carcinogénesis mamaria ([920], [1486], [3205]). Finalmente, el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados, fundamentalmente el ácido oleico (18:1n-9), presente en elevadas cantidades en el aceite de oliva, es de especial interés. Aunque cada vez existen más evidencias de un posible efecto protector del aceite de oliva virgen, experimentalmente existen resultados contradictorios. Así, se ha observado desde un efecto no promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama ([3568], [5321], [7144]).

Por lo que respecta a los carbohidratos, los estudios epidemiológicos no muestran asociaciones concluyentes entre el consumo de dichos glúcidos y el cáncer de mama ([6093]). Los trabajos que han hallado asociaciones positivas han postulado que los mecanismos a través de los que los carbohidratos ejercerían tales efectos serían debidos, al menos en parte, a su acción moduladora de los niveles circulantes de insulina y glucosa ([8630], [8634], [8635]).

Así, ha sido descrito que el incremento de insulina en sangre deriva en un incremento en la biodisponibilidad de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) ([8629], [8630]). Además, estudios realizados en líneas celulares de cáncer de mama han atribuido al factor IGF-1 propiedades mitogénicas y antiapoptóticas ([8631], [8632], [8633]), indicando que el aumento en los niveles de este factor tras la ingesta de carbohidratos podría jugar un papel relevante en el desarrollo de cáncer de mama, particularmente, en mujeres premenopáusicas ([8630], [8634], [8635]). Otros estudios “in vitro” han mostrado que los estrógenos podrían actuar sinérgicamente con el factor IGF-1 en la patogénesis del cáncer de mama, estimulando el crecimiento y la proliferación celular ([8636]). En cualquier caso, aunque algunas evidencias han asociado la ingesta de carbohidratos, el índice glucémico y la carga glucémica con el cáncer de mama ([8641], [8642]), sobretodo en mujeres premenopáusicas ([8643], [8644]), los datos no son del todo concluyentes ([8637], [8638], [8639], [8640]).

En relación a la ingesta de proteínas, los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos han sido contradictorios en cuanto a la asociación entre dicha ingesta y el riesgo de desarrollar ciertos tipos de neoplasias ([6093]). Pese a esto, algunos autores defienden que un elevado consumo de proteínas podría incrementar el riesgo de cáncer de mama también mediante el aumento de los niveles de IGF-1 ([8645], [8646]). En este sentido, a nivel experimental, un reciente estudio realizado en un modelo xenógrafo de cáncer de mama humano en ratón ha puesto de manifiesto que la restricción dietética de proteínas inhibe el crecimiento tumoral, en parte, mediante la disminución de la activación de mTORC1, como consecuencia del descenso en los niveles de IGF-1 (activador de la vía de señalización de mTOR) ([8647]).

En cuanto a la fibra dietética, a nivel epidemiológico múltiples estudios apoyan que el consumo de fibra podría proteger contra el desarrollo de cáncer colorrectal. En cáncer de mama, sin embargo, no se han hallado evidencias concluyentes ([6093]). Pese a ello, autores que defienden una asociación inversa entre el consumo de fibra y el riesgo de cáncer de mama han propuesto que la fibra dietética podría inhibir la reabsorción intestinal e incrementar la excreción fecal de estrógenos reduciendo, por tanto, su biodisponibilidad ([8649]). Otro de los mecanismos propuestos podría ser mediante la modulación de IGF-1. En este sentido, un estudio epidemiológico de intervención dietética relacionó positivamente la ingesta de fibra con los niveles de IGF-1, proteína con propiedades antiproliferativas y proapoptóticas debido a su unión a IGF-1 ([8648]). Además, se han descrito diversos componentes bioactivos presentes en los alimentos ricos en fibra que podrían estar ejerciendo, al menos en parte, dichas acciones beneficiosas ([8660]).

Estudios epidemiológicos han mostrado asociaciones inversas entre la ingesta de una amplia variedad de micronutrientes (minerales y vitaminas) y el riesgo de desarrollar diversos tipos de cánceres (calcio-cáncer colorrectal, selenio-cáncer de próstata, folato-cáncer de páncreas, etc.). En cuanto al cáncer de mama, los datos epidemiológicos publicados no son del todo concluyentes ([6093]). A nivel experimental, estudios en modelos animales de cáncer de mama así como trabajos “in vitro” han atribuido propiedades anticancerígenas, por ejemplo, a la administración de selenio ([8662], [8663]) y vitamina D ([8661]). En relación al folato, trabajos en modelos murinos han relacionado la deficiencia dietética de folato con una menor incidencia tumoral ([8664]), hallándose también una asociación positiva entre consumo de folato y la progresión tumoral ([8665]).

A parte de los macro- y micronutrientes, se han descrito una serie de compuestos nutricionales bioactivos con propiedades anticancerígenas. En este sentido, los polifenoles ejercerían acciones beneficiosas en cáncer de mama debido a sus propiedades antioxidantes, destacando dentro de este amplio grupo: el resveratrol (presente en las uvas), la epigallocatequina-3-galata (EGCG, catequina del té verde), la curcumina (presente en el curri) y la genisteína (isoflavona de la soja) ([8462]). Diversos estudios se han basado en identificar los mecanismos a través de los que los fitoestrógenos, como la genisteína, ejercerían sus acciones beneficiosas en cáncer de mama. En este sentido, trabajos “in vivo” e “in vitro” han descrito que las isoflavonas actuarían disminuyendo la peroxidación lipídica y el daño oxidativo del ADN debido a su capacidad antioxidante. Además, la estructura química de las isoflavonas es similar a la de los estrógenos, pudiendo ser capaces de competir con estas hormonas y unirse a sus receptores. También se ha descrito que estos fitoestrógenos son capaces de inhibir la síntesis de enzimas relevantes en la biosíntesis de hormonas esteroideas, disminuyendo los niveles de estrógenos circulantes. Por último, estudios en modelos animales y en líneas celulares han atribuido propiedades proapoptóticas y antiangiogénicas a las isoflavonas ([8653]).

Por otro lado, los isotiocianatos son un grupo de fitoquímicos que se encuentran en las crucíferas (coliflor, brócoli, repollo, etc). En un estudio epidemiológico se asoció la ingesta de brócoli con una disminución significativa de las roturas de la cadena de ADN en leucocitos ([8464], [8465]). El sulforafano, el isotiocianato más ampliamente estudiado, ha mostrado una protección significativa contra el cáncer de mama inducido químicamente con DMBA en ratas ([8466]). En trabajos realizados “in vitro”, los isotiocianatos también han mostrado propiedades proapoptóticas y antiproliferativas ([8463]). Otro componente relevante es el licopeno, un fitoquímico perteneciente al grupo de pigmentos conocidos como carotenoides y

presente en diversas frutas y verduras como el tomate. En trabajos “in vitro”, este compuesto no únicamente mejora la respuesta antioxidante de células de cáncer de próstata, sino que es capaz de inhibir la proliferación, inducir apoptosis y disminuir la capacidad metastásica de dichas células ([8467], [8468]). En cáncer de mama, se ha relacionado la ingesta de licopeno con un menor riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia ([8469]).

Actualmente existen múltiples estudios centrados no únicamente en hallar la influencia sobre el cáncer de mama de los componentes nutricionales aislados, sino en determinar la relación entre patrones dietéticos y el desarrollo de este tipo de neoplasia. En general, los más investigados serían los patrones de dieta saludable (rica en verduras y/o frutas, pescado, aves, productos lácteos bajos en grasa y/o cereales integrales) y la llamada dieta poco saludable (rica en carne roja, granos refinados, dulces y/o productos lácteos altos en grasa). Aunque en general los análisis muestran que tanto los patrones dietéticos con alto consumo de frutas y hortalizas ([8470], [8471], [8472]) como los de alta ingesta de fibra y bajo contenido en grasa ([8473]) estarían inversamente asociados con el riesgo de cáncer de mama, no todos los estudios encuentran asociaciones significativas ([8474], [8475], [8476], [8477]). Pese a ello, se ha tener en cuenta que la relación entre los patrones dietéticos y el riesgo de cáncer de mama dependen de otros factores como el tipo tumoral ([8478]). Por ejemplo, en enfermas de cáncer de mama con tumores RE⁺ se ha observado una mayor ingesta de frutas y verduras que en enfermas con tumores RE⁻ ([8479], [8480]). Además, el efecto de una dieta saludable en cuanto a la reducción del riesgo de cáncer de mama es mayor en tumores RE⁺/RP⁻ ([8481]). De forma similar, los efectos de los patrones dietéticos no saludables sobre el riesgo de cáncer de mama dependen de otros factores tales como el estado menopáusico ([8482]), el IMC ([8483]) y el tipo tumoral ([8484], [8485]). En cuanto a la Dieta Mediterránea, caracterizada por el elevado consumo de aceite de oliva, ésta se ha asociado a una menor incidencia de ciertos cánceres, incluyendo el de mama, así como de enfermedades cardiovasculares ([4743], [6051]). Esta dieta incluye la variedad de patrones dietéticos de las distintas regiones del Mediterráneo y se identifica por el abundante consumo de productos de origen vegetal (frutas, vegetales, cereales y frutos secos), productos frescos, pescado, y el ya mencionado aceite de oliva ([7107]). El aceite de oliva virgen extra corresponde al obtenido tras la primera prensada y se caracteriza por su riqueza en ácido oleico (72-84%), pero también por la presencia de abundantes compuestos minoritarios bioactivos, como escualeno y antioxidantes fenólicos (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína), secoiridoides, flavonoides y lignanos ([7105], [4399]). Actualmente, está bien establecido que el efecto potencialmente saludable del aceite de oliva virgen extra es debido tanto a su composición lipídica (especialmente su alto contenido en ácido oleico, su

apropiado contenido en PUFA esenciales y su baja ratio PUFA n-6/PUFA n-3), como a sus compuestos minoritarios ([6302], [7159], [8018]). Las diferencias o contradicciones halladas entre distintos estudios sobre el efecto del aceite de oliva en el cáncer, así como la falta de una asociación significativa en algunos estudios epidemiológicos, podrían estar relacionadas con la utilización de los nutrientes químicamente definidos y aislados (ácido oleico y componentes minoritarios) o el alimento (aceite de oliva). Del mismo modo, la composición exacta del aceite de oliva difiere entre las distintas variedades. Ésta depende, no sólo del origen geográfico, sino también de otros factores como las condiciones de cultivo en el correspondiente año de la recogida, el grado de maduración del fruto y el procedimiento técnico de procesado (prensado en frío, refinado). De hecho, las ratios entre ácidos grasos insaturados/saturados y ácido oleico/linoleico, y la composición de antioxidantes y otros compuestos minoritarios, serían factores clave en el efecto final del aceite de oliva en la carcinogénesis.

2. ACTIVIDAD FÍSICA

La actividad física, elemento indispensable en el denominado estilo de vida saludable, se define como cualquier movimiento corporal producido por el músculo esquelético y que resulta en un incremento sustancial del gasto energético. Existen distintos tipos de actividad física diaria: la ocupacional llevada a cabo en el trabajo, la doméstica que comprende todas las tareas que forman parte del día a día en el hogar, el transporte hasta y desde el lugar de trabajo, y la actividad recreativa elegida durante el tiempo libre. A su vez, el ejercicio físico, expresado en unidades metabólicas ó METs, puede ser clasificado en función de la intensidad en vigoroso (≥ 6 METs), moderado (3-5,9 METs) ó ligero (< 3 METs). De forma que la combinación de la frecuencia, la intensidad y la duración son los parámetros que determinan los niveles totales de actividad física de un individuo. Sin embargo, el gasto energético de cada individuo para una determinada actividad depende tanto del metabolismo basal como de otros parámetros, tales como la edad, el sexo, la talla y la forma física ([6093]).

Los efectos de la actividad física sobre la salud varían en función del grado de intensidad y de la frecuencia. Así, en mujeres atletas se han descrito una serie de alteraciones asociadas a la realización de ejercicio físico intenso, tales como amenorrea, osteoporosis y desordenes alimenticios. En este sentido, el perfil hormonal de estas mujeres se caracteriza por presentar hipoprogesteronismo, debido a la supresión de la secreción pulsátil de GnRH que afecta a la secreción de LH, provocando una disminución de los niveles de FSH y, por tanto, de los

niveles de estradiol, derivando en alteraciones del ciclo menstrual ([8651]). Sin embargo, la realización de actividad física de forma moderada parece ejercer un efecto protector frente al desarrollo de numerosas patologías, incluyendo entre ellas determinados tipos de cáncer como el de colon y endometrio ([6093]). Por lo que respecta al cáncer de mama, el ejercicio físico moderado ha mostrado una asociación inversa con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, sobretodo en mujeres postmenopáusicas ([6093]). Los estudios epidemiológicos realizados en mujeres premenopáusicas y menopáusicas no obtuvieron resultados concluyentes, sin embargo, éstos sugieren una disminución del riesgo ([6093]). Los efectos beneficiosos de la actividad física sobre el cáncer de mama podrían ser debidos a través de distintos mecanismos. Por una parte, mediante el ejercicio físico se reducirían los niveles de hormonas esteroideas endógenas (estrógenos y andrógenos), así como de insulina y de IGF-I, disminuyendo de este modo la resistencia a insulina ([8666]). Por otra parte, la actividad física también reduciría los niveles de citoquinas, reduciendo el grado de inflamación ([8486]). Además, el ejercicio físico ayuda a mantener el peso corporal, factor de riesgo de múltiples patologías, incluido el cáncer de mama ([6093]).

3. OTROS

A parte de los factores nutricionales y la actividad física, existen otros factores relacionados con el estilo de vida que presentan cierta influencia en el cáncer de mama, como la obesidad, determinados parámetros antropométricos, la paridad, la lactancia, el consumo de alcohol y tabaco y/o la exposición ambiental a agentes carcinogénicos, entre otros.

Por lo que respecta a la obesidad, ésta es considerada un factor de riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, mientras que se ha sugerido que podría disminuir dicho riesgo en mujeres premenopáusicas, aunque los resultados no son concluyentes ([1700], [6093]). Esta diferencia en cuanto al estatus menopáusico podría ser debida a que durante la premenopausia el exceso de adiposidad podría modificar la función ovárica, provocando alteraciones en la secreción de hormonas que actúan a nivel de la glándula mamaria. En este sentido, se ha descrito que mujeres con bajo número de ciclos menstruales por año, largos ciclos y/o ciclos irregulares presentan un bajo riesgo de cáncer de mama, probablemente debido a alguna insuficiencia ovárica ([8654]). Las mujeres obesas premenopáusicas tienden a tener menstruaciones irregulares así como reducción de la fertilidad. En el caso de las mujeres obesas postmenopáusicas, la conversión en el tejido adiposo de los andrógenos suprarrenales a

estrógenos, por una aromatasa, explicaría, entre otros, el mayor riesgo de padecer cáncer de mama en estas mujeres ([4595]). Por otro lado, pese a que la terapia hormonal sustitutiva se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama ([8667]), en mujeres obesas este tratamiento no incrementaría aún más el riesgo, hecho que sugeriría que los niveles elevados de estrógenos, independientemente de si provienen de fuentes endógenas o exógenas, aumentan el riesgo de cáncer de mama, y que los efectos no son aditivos. A parte de su relación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, la obesidad también se relaciona positivamente con la recurrencia y mortalidad asociadas a este tipo de cáncer, tanto entre mujeres pre- como postmenopáusicas, independientemente de la edad y del estatus de los receptores de estrógenos (RE^+ , RE^-) ([8652], [8656]).

Otro factor a tener en cuenta sería la distribución de la adiposidad. Así, numerosos estudios epidemiológicos han evaluado la relación entre diversos parámetros antropométricos y el riesgo de cáncer de mama. Entre los parámetros más relevantes se encontrarían el índice de masa corporal (IMC), el índice cintura-cadera (ratio ICC), el índice cintura-altura y la circunferencia de la cintura. Dado que el IMC es el parámetro empleado para clasificar los grados de obesidad, no es de extrañar las abundantes evidencias epidemiológicas que indican la asociación positiva entre este parámetro y el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. Por otro lado, tanto el ICC como la circunferencia de la cintura, parámetros empleados para determinar la grasa abdominal, podrían presentar una asociación, también positiva, con el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, pese a que las evidencias epidemiológicas halladas no son del todo concluyentes ([6093]).

Otra serie de factores tales como la nuliparidad, una primera gestación tardía, la menarquia precoz y la menopausia tardía también han sido asociados a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, evidenciando la relevancia hormonal en el desarrollo de este tipo de neoplasia ([3950], [3966], [5975]). Así, la nuliparidad o un primer embarazo en edad avanzada constituyen factores de riesgo debido a que en estos casos la glándula mamaria no alcanzaría su máxima diferenciación, o bien la alcanzaría muy tarde. El avance de la pubertad (menarquia precoz) y la menopausia tardía también son factores de riesgo ya que aumentan el número total de ciclos reproductivos en los que la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución, lo cual influye en su susceptibilidad a la carcinogénesis. Además, en la menarquia precoz se induce una proliferación temprana de las células mamarias por exposición a elevados niveles hormonales ([5975], [6093], [6828], [7616], [7627]). Por otro lado, estudios epidemiológicos prospectivos y de casos-control, han mostrado claras evidencias de que la lactancia protege contra el cáncer de mama tanto en mujeres pre- como

postmenopáusicas, debido al periodo de amenorrea e infertilidad asociado y, consecuentemente, a la disminución del tiempo de exposición a los ciclos menstruales ([6093]).

Diferentes estudios han mostrado que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de cáncer de mama, independientemente del tipo de bebida alcohólica y del estatus menopáusico. Esto podría ser debido, en parte, a que tras la ingesta de alcohol, los niveles de estrógenos circulantes aumentan. Entre los mecanismos propuestos para explicar tal aumento, se encontrarían el incremento de la actividad de la aromatasa (enzima responsable de la conversión de testosterona en estrógenos), la inhibición de enzimas implicados en la degradación de estrógenos, la disminución de la secreción de melatonina (implicada en la inhibición de la producción de estrógenos) y/ o el incremento del estado redox hepático disminuyendo así el metabolismo esteroideo. Además, los productos obtenidos tras el metabolismo del alcohol, tales como el acetaldehído y los radicales libres, podrían causar daño en el ADN favoreciendo el proceso carcinogénico. Por otro lado, el alcohol es un antagonista del folato, micronutriente importante en la síntesis y reparación del ADN así como en la neutralización de los radicales libres. Así, el consumo de alcohol podría afectar negativamente a los niveles de folato, alterando dichos procesos ([6093]).

En cuanto al consumo de tabaco, éste ha sido claramente asociado con otros tipos de cánceres, debido al alto contenido de sustancias potencialmente carcinogénicas presentes en el humo del tabaco, tales como: formaldehído, benzopireno, anilina, hidrazida, arsénico, cadmio y cromo. En relación al cáncer de mama, la asociación entre el consumo de tabaco y esta neoplasia ha mostrado resultados inconsistentes. No obstante, las evidencias apuntan a un aumento del riesgo tras un largo periodo de hábito tabáquico, inicio antes del primer embarazo a término, y en fumadores pasivos ([7675]).

Otro factor a tener en cuenta es la continua exposición a contaminantes medioambientales hormonalmente activos a los que está sometida la población. Entre ellos destacan los compuestos clorados (en pesticidas), alkifenólicos (en detergentes, plásticos, espermicidas, etc.) y el bisfenol-A y/o derivados, por su influencia en el desarrollo del cáncer de mama ([4506], [4651], [4653], [4662], [4713], [7678], [7679], [7681]).

D. LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA: MECANISMOS

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

1. CRECIMIENTO, MADURACIÓN SEXUAL Y OBESIDAD

Diversas evidencias epidemiológicas sugieren que determinados aspectos de la fertilidad y la maduración sexual se encuentran entre los factores de riesgo del cáncer de mama.

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

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

adipoquinas se encuentra la Adiponectina, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y la Leptina ([7542], [7655], [7656]).

Leptina y Adiponectina regulan la secreción de GnRH ([7619]). La hormona Leptina, es producida principalmente en tejido adiposo y, en menor medida, en células epiteliales de la glándula mamaria, ovarios, estómago y placenta ([7542], [7622]). Sus niveles circulantes se correlacionan positivamente con el peso corporal y la cantidad de grasa ([7657], [7658]). La Leptina informa al hipotálamo de los niveles de reservas energéticas y adiposidad, el peso corporal y el estado nutricional, a la vez que participa en la regulación del apetito y la termogénesis ([5795], [5797], [6658], [7622]). Actualmente, está establecido que Leptina actuaría como un importante regulador del sistema hipotalámico de Kisspeptina y, por tanto, de la funcionalidad del eje reproductivo ([5796], [5869]). Por otra parte, se ha atribuido a la Leptina un papel en el desarrollo epitelial de la glándula mamaria promoviendo la proliferación celular ([4865]). Además, se ha descrito expresión de su receptor en diversos tipos de tumores incluidos los de mama ([7663], [7668], [7669]). Adiponectina parece realizar una función opuesta a Leptina, es decir, inhibiría la proliferación celular. Por este motivo, los niveles de ambas adipoquinas y sus respectivos receptores podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis mamaria ([7541], [7542], [7546]).

Existen evidencias de la influencia de los lípidos de la dieta en el crecimiento y la maduración sexual. Una dieta con elevada cantidad de grasas puede producir el adelantamiento de la pubertad ([5975], [6093], [6828], [7616], [7664]). Este efecto, no obstante, parece depender del tipo de grasa consumida. Resultados previos del equipo investigador han demostrado un claro adelantamiento de la maduración sexual por efecto de las dietas hiperlipídicas ricas en PUFA n-6 mientras que el aceite de oliva virgen extra ejerció una débil influencia ([6887]). Este efecto estaría relacionado con que distintos tipos de grasas de la dieta pueden afectar de diferente manera al peso y masa corporal, influyendo a la vez en el metabolismo del tejido adiposo ([6599]). El mecanismo de este efecto diferencial podría estar directamente relacionado con las características de los ácidos grasos, como el tipo de estructura, la longitud de la cadena o el grado de insaturación (número de dobles enlaces) ([7475]). Estos datos estarían de acuerdo con estudios epidemiológicos que han asociado diferentes patrones dietéticos con el riesgo de desarrollar obesidad. En este sentido, la Dieta Mediterránea, cuya principal fuente de grasa es el aceite de oliva, ha sido inversamente asociada con la obesidad, a pesar del contenido relativamente elevado de grasa de esta dieta ([7102], [7625]). Uno de los mecanismos por los cuales el aceite de oliva podría tener efectos beneficiosos sobre el peso corporal sería a través de la molécula oleiletanolamida (OEA)

([7168], [7210]). La OEA es un ácido graso etanolamida, también conocido como N-aciletanolamida. Ésta familia de moléculas lipídicas señalizadoras se localiza principalmente en el intestino delgado, tejido adiposo, neuronas aferentes y en varias zonas del cerebro. Existe una fuente de OEA exógena, a través de la ingesta de nutrientes con ácido oleico, así como una fuente endógena. En este caso, se sintetiza a partir de fosfatidilcolina cuando las células son estimuladas por agentes despolarizantes, neurotransmisores y hormonas ([7168], [7178], [7206], [7218]). OEA juega un papel importante en el control central y periférico de la ingesta, que se produce de forma integrada con el control nervioso y hormonal de la saciedad ([7206], [7212], [7495]).

2. INFLUENCIA SOBRE EL ESTATUS HORMONAL

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

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

Por otro lado, se ha descrito que los PUFA n-6 pueden aumentar la estrogenicidad a tres niveles: 1) por desplazamiento de los estrógenos de su proteína transportadora, incrementando los niveles de hormona libre; 2) aumentando la afinidad por su receptor; y 3) inhibiendo la

actividad de la enzima 17β -deshidrogenasa e impidiendo, de esta forma, el paso de estradiol a estrona ([976], [3421], [3568]). Además, un incremento en el consumo de EPA, a través de la ingesta de pescado, disminuye la formación de prostaglandina E2 (PGE_2), un metabolito del ácido araquidónico que estimula la actividad de la aromatasa P450, lo cual disminuiría la producción local de estrógenos y el crecimiento estimulado por éstos ([4546]). Asimismo, el aumento de la ingesta de grasas causa un incremento de la secreción biliar, cuyos ácidos biliares y derivados del colesterol pueden ser transformados a estrógenos por ciertas bacterias de la flora intestinal ([1666]). En este sentido, la actividad moduladora de la biosíntesis de ácidos biliares característica del escualeno, componente minoritario del aceite de oliva virgen, podría contribuir al potencial efecto protector de este aceite en la carcinogénesis ([3619]). Por otro lado, los lignanos, otros componentes minoritarios del aceite de oliva virgen, presentarían efectos antiestrogénicos debido a su semejanza estructural con el estradiol y el antiestrogénico sintético tamoxifeno ([4743]). A pesar de las relaciones sugeridas anteriormente, no se han encontrado diferencias claras en los niveles de esteroides gonadales por efecto de las dietas hiperlipídicas ([918], [934], [1046], [1678], [2265]).

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

Por otra parte, se ha postulado que el efecto de los lípidos de la dieta podría estar relacionado con los receptores esteroideos. En ratas alimentadas con dietas ricas en PUFA n-6 se ha descrito un aumento en el nivel de RE en la glándula mamaria de animales vírgenes y de ratas gestantes ([3588]). Sin embargo, en otros estudios, la ingesta de dietas ricas en grasas no ha mostrado influencias sobre los niveles de receptores de estrógenos y progesterona en glándula mamaria ([1046], [5664]).

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

3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR

La composición en lípidos polares (fosfolípidos, esfingomiélin y cardiolipina en mitocondria) y el contenido en colesterol de las membranas celulares están finamente

regulados por las células, y pueden variar en función de los lípidos que habitualmente se ingieren ([1047], [1518], [2264], [3185]). Las membranas celulares parecen mantener relativamente constante sus niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados dentro de un amplio rango de variación en la dieta de estos ácidos grasos. La composición de la membrana es más sensible a los niveles de PUFA n-6 y n-3 de la dieta, y especialmente a los PUFA n-3 y a la ratio n-3/n-6 ([4818], [6338]). Los cambios en el perfil lipídico de las membranas celulares debidos al consumo de un tipo concreto de grasa pueden modificar el comportamiento celular mediante la influencia en la fluidez de la membrana, las vías de transducción de señales y el grado de peroxidación lipídica en dichas membranas ([4541]). Así, elevadas cantidades de PUFA n-6 en las membranas se han asociado a una mayor tasa de proliferación celular ([1355], [4324]).

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

Por otro lado, se ha sugerido un papel de los lípidos de la dieta en la organización de los microdominios de la membrana plasmática, en concreto los conocidos como balsas lipídicas o *lipid rafts*, y en especial las caveolas ([5449], [5451], [6336]). Las balsas lipídicas son dominios pequeños (10-200 nm) y representan el 10-15% del área de la membrana plasmática

([4914]). Se caracterizan por su composición lipídica rica en colesterol, esfingolípidos y lípidos que contienen cadenas de ácidos grasos saturados ([6339], [7249]). Existen al menos dos variedades morfológicamente distinguibles de *lipid raft* en la superficie celular: las caveolas y los *flat raft* o dominios G. Las caveolas son invaginaciones de membrana con forma de matraz de 50-100 nm y están enriquecidas con la proteína Caveolina ([4914], [5447], [5449]). Tales microdominios están implicados en señalización celular, endocitosis, transcitosis, tráfico de colesterol y adhesión ([4541], [4547], [4615], [4914], [5447], [5449], [5451]), lo que explicaría su papel en diversos tipos de patologías, entre ellas el cáncer ([4744], [6290]). La función de los *lipid rafts* en la transducción de señales podría ser la de concentrar los receptores para que éstos interactúen con sus ligandos y efectores de ambos lados de la membrana ([4216]). En este sentido, se ha descrito la localización de algunos de los componentes de la vía de señalización intracelular mediada por la proteína Ras, incluyendo la propia p21Ras, en estos microdominios de membrana ([4198], [5465], [5481]). En colon de ratones, se ha observado una disminución de la activación de la proteína Ha-ras por efecto de los lípidos n-3 de la dieta, en comparación con los lípidos n-6, asociada con cambios en la composición lipídica y proteica de las caveolas ([4614]). Asimismo se ha descrito un desplazamiento de Ha-ras por efecto de dichos lípidos, y como consecuencia, la supresión de la vía de señalización de Ras, así como una disminución del contenido de esfingolípidos en los *lipid rafts* ([6339]).

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

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

4. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

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

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

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

5. ESTRÉS OXIDATIVO

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

Alteraciones en las enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa, Glutación Peroxidasa (GPx)) y en antioxidantes no enzimáticos (Glutación (GSH), vitamina C, Tiorredoxina (TRx)), así como en vías de señalización relacionadas, son comunes en muchos tipos de cáncer ([5812], [6456]) y en particular en cáncer de mama ([6083]). Aunque existen discrepancias entre los numerosos estudios realizados, en general, se ha descrito una disminución de la capacidad antioxidante en las células tumorales respecto al tejido sano, lo que podría favorecer la formación de lesiones en el ADN, y conferiría a la célula tumoral un fenotipo más agresivo y, por tanto, un peor pronóstico ([5845], [6456], [6095], [6440]). Con respecto a los estudios sobre la capacidad antioxidante no enzimática se ha observado que, tanto en humanos como en modelos experimentales, el resultado más frecuente es la disminución de los niveles de GSH y el aumento de la ratio GSSG/GSH como reflejo del estrés oxidativo en pacientes con cáncer o animales inducidos con carcinógeno ([6063], [6712], [6720], [6728], [6756]). Se han relacionado los bajos niveles de GSH con una menor proliferación del tejido mientras que el aumento de la ratio implicaría una situación de mayor estrés oxidativo ([6756], [6761]). Por el contrario, también se han encontrado altos niveles de glutación en tumores mamarios como respuesta a la situación de elevado estrés oxidativo ocasionada por la enfermedad cancerosa ([6715]). Esta situación podría favorecer la proliferación y reducir la apoptosis de las células tumorales ([5879], [6759], [6760], [6764]). La regulación de la apoptosis mediante el estado redox, promoviendo proliferación en un medio reducido e induciendo apoptosis en un estado de oxidación, es un mecanismo que podría favorecer o interferir en el proceso carcinogénico en sus diferentes etapas ([6077], [6144]).

El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica juegan un papel importante en el efecto que los factores nutricionales pueden ejercer sobre la carcinogénesis. El estado redox de la célula puede ser modificado por el tipo de dieta. De hecho, la mayoría de antioxidantes no enzimáticos se adquieren a través de ella, como por ejemplo las vitaminas C y E, los compuestos polifenólicos, el selenio y los antioxidantes tiol, entre otros. Algunos estudios han demostrado los efectos sobre el estado redox de la célula de compuestos como los polifenoles del té negro, la fibra, pero sobretodo de los diferentes tipos de ácidos grasos ([3339], [6141]). Entre ellos, los PUFA n-3 podrían presentar un mayor efecto antioxidante debido, en parte, a la estimulación de la actividad enzimática de SOD, GPx y catalasa ([6692]). En relación al aceite de oliva virgen, éste debe su capacidad antioxidante a sus componentes minoritarios. Así, aceites de semillas enriquecidos con ácido oleico presentan los mismos efectos que un aceite de oliva refinado ([4631]. [6611], [6692]). Por otra parte, la ingesta de aceite de maíz, rico en PUFA n-6, supone un aumento del estrés oxidativo que podría afectar a las enzimas antioxidantes

disminuyendo su nivel de actividad ([6753]). En cambio, se ha descrito que los polifenoles de origen dietético podrían favorecer el aumento de los niveles de GSH a través de la enzima γ -glutamylcisteina sintetasa puesto que se han encontrado regiones de elementos de respuesta antioxidante (ARE) en su región promotora ([6513]). Además, resultados propios del grupo han demostrado que la disminución de la capacidad antioxidante en los tumores mamarios es mayor en los animales alimentados con dietas hiperlipídicas respecto a la dieta control.

6. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Los lípidos de membrana, por la acción de varias fosfolipasas (PLA₂, PLC, PLD) activadas por complejos agonista-receptor, pueden generar gran cantidad de moléculas bioactivas que actúan como segundos mensajeros o como moduladores dentro de la cascada de señalización intracelular ([2789], [4541]). Entre ellas, inositol-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (“free fatty acids”, FFA) que activan PKC, y ácido fosfatídico que, además, puede ser metabolizado a DAG. Asimismo, el ácido fosfatídico actuaría, como coactivador de la vía de MAPK junto con p21Ras ([2260], [2430], [3695], [3701]). Por lo tanto, los cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana que se puedan producir por modificaciones en la cantidad o el tipo de lípidos de la dieta, afectarán a la producción y composición de los segundos mensajeros, alterando la expresión génica y la función celular ([3947]). Se ha comprobado que algunas dietas hiperlipídicas incrementan el nivel de DAG y la cantidad de PKC asociada a la membrana ([1942], [2054]). Además, los FFA modifican las actividades de las fosfolipasas, PKC y otras quinasas, proteínas G, ciclasas, así como canales iónicos y la movilización del calcio ([2137], [2264], [2276], [2430], [2556]). Por el contrario, el ácido araquidónico inhibe algunas quinasas ([2137]). También se ha descrito que los PUFA oxidados inhiben tirosina fosfatasa (PTPasas), y por tanto incrementarían en general la fosforilación de tirosinas de las proteínas celulares. En trabajos “in vitro” se ha comprobado que determinados metabolitos del ácido linoleico pueden inhibir la defosforilación del EGFR, aumentando así la cascada de señalización intracelular ([3535], [3824], [5612]). Sin embargo, en adenocarcinomas mamarios experimentales no se han observado cambios en la actividad de EGFR por efecto de los lípidos de la dieta ([6879]).

Los lípidos de la dieta pueden afectar la actividad de las proteínas Ras, reguladores críticos de la función celular, como el crecimiento, diferenciación y apoptosis, aunque los mecanismos no son aún conocidos. En este sentido, en el modelo de cáncer de colon inducido con

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

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

Por otra parte, a partir de los fosfolípidos de membrana se producen FFA precursores de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos). Existen dos familias de eicosanoides; los derivados del ácido linoleico (n-6), vía ácido araquidónico, y los derivados del ácido linolénico (n-3), vía EPA ([3185]), que muestran diferentes efectos, en algunos casos, contrarios ([2050]). PGE₂, producto del ácido araquidónico, promovería la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular, y potenciaría la progresión tumoral, promocionando la angiogénesis del tumor y las metástasis ([4324], [4546]). En este sentido, el efecto promotor tumoral de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama se ha correlacionado con una mayor producción de prostaglandinas ([1107]). Los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas bloquean parcialmente el efecto promotor de las dietas hiperlipídicas ricas en PUFA n-6 en la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA ([2245], [2265]). En relación a los PUFA n-3, CLA y ácido oleico, se ha postulado que su efecto protector se basaría en la utilización de las mismas enzimas de la síntesis de prostaglandinas que los PUFA n-6. Este hecho induciría un cambio en las proporciones del tipo de eicosanoides sintetizados ([3567], [3568], [3569], [4546]). Además, en el aceite de

oliva, los compuestos minoritarios como el hidroxitirosol o el escualeno, también pueden influir en el metabolismo lipídico, disminuyendo los niveles de intermediarios lipídicos, que en el caso del escualeno implicaría una disminución de la prenilación de Ras, necesaria para su activación ([3229], [3619], [3620], [3771], [5767]).

7. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Se ha descrito que diferentes componentes de la dieta (PUFA, colesterol, glucosa/fructosa, determinados minerales y vitaminas liposolubles) pueden modular específicamente la transcripción génica, el procesamiento y la estabilidad de los transcritos de genes implicados en diversas vías del metabolismo (glucólisis, lipogénesis, etc.) ([2415], [2542], [4540]). En relación a los lípidos, éstos podrían influir en la expresión génica de dos modos diferentes: un control directo, rápido y agudo de los niveles de expresión, y una modulación adaptativa a largo plazo de la composición de la membrana celular que podría modificar a su vez la señalización intracelular ([2415], [4540]). Los ácidos grasos o sus metabolitos han demostrado poder controlar la actividad de algunos factores de transcripción, mediante su unión y activación de varios receptores nucleares, incluyendo las familias de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), el receptor X hepático (LXR) y las dos familias de receptores del ácido retinoico (RxR y RAR). Además, los ácidos grasos pueden actuar alterando la actividad o la abundancia nuclear de los factores de transcripción sin necesidad de unirse a ellos, como es el caso de NF- κ B (“Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”), SREBP (“sterol-regulatory element-binding proteína”), c/EBP β (CCAAT/“enhancer-binding protein B”) y HIP-1 α (“hypoxia-inducible factor-1 α ”) ([4541], [4543]).

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

Existen cada vez más evidencias de que los lípidos también pueden regular la expresión de genes implicados en la transformación neoplásica. Trabajos “in vitro” realizados en diferentes líneas celulares humanas de cáncer de mama tratadas con PUFA n-3 mostraron cambios en la expresión de genes implicados en apoptosis, señalización intercelular, comunicación celular, metabolismo o interacción con patógenos. Por el contrario, tal efecto no fue observado en el caso de los PUFA n-6 ([7154]). Por otra parte, la administración de ácido linoleico a células tumorales mamarias indujo cambios en la expresión del receptor de estrógenos α , la proteína G G13a, la p38 MAPK, así como de genes implicados en la regulación del ciclo celular y la transcripción del ARN ([4542]). Los ácidos grasos insaturados han demostrado poder reducir significativamente el tiempo de duplicación de las células mamarias normales y tumorales en cultivo, provocando un aumento de la actividad mitótica ([918]). Este efecto se ha relacionado con una regulación de la expresión de genes implicados en el ciclo celular, como por ejemplo p53 y c-fos ([2227], [2272]). Datos propios del grupo de investigación demostraron que la dieta hiperlipídica PUFA n-6 disminuye la expresión del gen PCPH, implicado en la diferenciación de la glándula mamaria a través, al menos en parte, de una actuación sinérgica con Ras ([4811], [5321]). Además, la ingesta de dicha dieta aumenta los niveles de ARNm de β -Actina y de su transportador ZBP1, cuya desregulación se asocia con un fenotipo tumoral de mayor malignidad ([5965]).

El efecto promotor de las dietas ricas en PUFA n-6 en carcinogénesis mamaria y de colon también se ha asociado a la sobreexpresión de los genes ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. Por el contrario, las dietas hiperlipídicas PUFA n-3 ejercerían un efecto antitumoral a través de la inhibición de la expresión de COX-3 ([3616], [4324], [4546], [6769]). Algunos oncogenes y genes supresores de tumores, también pueden ser regulados por los ácidos grasos, directa o indirectamente. Entre ellos se encuentran HER2/Neu (ErbB2) ([5149]), c-myc y c-Ha-ras ([1854], [2984]), c-fos y COX-2 ([5041]), p53, Bcl-2, Bcl-XL y Bak ([2272], [3012]) y BRCA1 y BRCA2 ([3857], [4325]) entre otros. Otros estudios han demostrado efectos sobre genes involucrados en angiogénesis, invasión y metástasis, como CDH1 (E-cadherina) ([4401]), MASPINA ([3983]) y algunas moléculas mediadoras de la cascada angiogénica como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el derivado de plaquetas (PDGF), el de fibroblastos (FGF), COX-2, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el factor de necrosis tumoral α (TNF α), metaloproteasas de matriz (MMPs) y β -Catenina ([7151]).

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

implicados en el metabolismo lipídico. Los resultados obtenidos, junto con los cambios observados en el perfil lipídico y el peso y masa corporal, sugieren que el cáncer modifica la regulación de dichos genes por los lípidos de la dieta, así como la expresión de PPAR α ([4743]). Además, se ha observado un efecto diferencial de distintos tipos de lípidos, ya que la dieta hiperlipídica de aceite de oliva, pero no la de maíz, incrementó la expresión hepática de la proteína UCP2, desacopladora de la cadena respiratoria. Dicho efecto aumentó la relación ingesta/gasto energético, lo que se relacionó con un menor peso corporal y con el desarrollo de tumores de menor grado de malignidad ([8657]).

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

Más recientemente, el grupo de investigación ha estudiado el efecto sobre la expresión de grupos de genes implicados en los distintos “hallmarks” de las células tumorales, descritos por Hanahan y Weinberg ([3973], [7349]). Los resultados han demostrado que las dietas ricas en PUFA n-6 disminuyen la expresión de genes implicados en vías de apoptosis y del sistema inmune, no sólo en la glándula mamaria sana sino también en los tumores. En cambio, las dietas ricas en aceites de oliva virgen extra aumentan la expresión de genes implicados en la apoptosis. Este diferente perfil de expresión inducido por ambos tipos de dieta se asocia con el diferente grado de malignidad de los tumores experimentales demostrado en cada caso ([8657]).

E. ALTERACIÓN DE LOS PATRONES EPIGENÉTICOS EN LA CARCINOGENESIS MAMARIA

El término epigenética, acuñado por Conrad Hal Waddington en 1942 ([8487]), hace referencia a la disciplina biológica basada en el estudio de modificaciones heredables en la función génica y que se producen sin alterar la secuencia de nucleótidos del ADN. Estas modificaciones se producen a lo largo del genoma y, en su conjunto, reciben el nombre de epigenoma. Existen numerosas evidencias del papel fundamental de la epigenética en la fisiología del desarrollo y de la diferenciación celular, regulando procesos tales como: el “splicing” alternativo, la expresión tejido-específica, el silenciamiento de elementos transponibles, la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y la identidad celular, entre otros. Por esta razón, diversas patologías incluyendo el cáncer se relacionan con alteraciones en procesos epigenéticos ([8488]). Contrariamente a las alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos son reversibles, pudiendo ser modificados por factores ambientales, entre ellos el estilo de vida y la dieta ([8489]).

1. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Las modificaciones epigenéticas conforman un código que regula la expresión génica e incluye: la metilación del ADN, la modificación postraducciona l de las histonas, los complejos remodeladores de la cromatina y los ARNs no codificantes.

1.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación post-replicativa que consiste en la adición covalente de un grupo metilo en la posición 5' del anillo pirimidínico de citosinas seguidas de guaninas, llamadas dinucleótidos CpG (“Cytosine-phosphate-Guanine”). Estudios recientes en cerebro han demostrado la existencia de formas alternativas de metilación en citosinas no seguidas de guanina (“non-CpG methylation”), aunque su relevancia funcional no ha sido elucidada ([8668]). Por su parte, los dinucleótidos CpG no se encuentran uniformemente distribuidos en el genoma, sino que tienden a concentrarse en regiones denominadas islas CpG, formadas por entre 200-2000 pares de bases con una proporción de CpG superior al

50% y un promedio de CpG observado/esperado mayor de 0,6. A su vez, la distribución de citosinas metilables en el genoma sigue un patrón bimodal, según el cual los dinucleótidos CpG incluidos en islas CpG carecen de metilación, mientras que los que se encuentran fuera de ellas, están metilados. En base a este concepto, en el genoma humano se identifican dos tipos de genes: constitutivos y tejido-específicos. Los genes constitutivos, que corresponden al 70% de todos los genes, presentan promotores con un porcentaje normalizado de CpG en torno al 0,61 y, por tanto, sus islas CpG contienen citosinas en estado no metilado, permitiendo la transcripción génica. Por el contrario, los genes tejido-específicos presentan promotores que no suelen estar asociados a islas CpG ya que tienen un promedio de CpG alrededor del 0,23, de forma que los dinucleótidos CpG están metilados, restringiendo su expresión a determinados tejidos o tipos celulares ([8490]).

La metilación del ADN es un proceso de gran relevancia biológica que no ocurre únicamente a nivel gen-específico regulando la expresión génica, sino que también regula procesos a nivel genómico. En este sentido, se ha descrito que la metilación en regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, es crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas ([8492]). Del mismo modo, la metilación de secuencias repetitivas del genoma de tipo transposones, como secuencias LINE-1 (“Long interspersed nuclear element-1”) ó SINE (“Short interspersed nuclear element”), evitaría la movilización de los mismos, impidiendo fenómenos de inestabilidad cromosómica ([8493]).

En general, la metilación de citosinas se asocia con silenciamiento génico a través de distintos mecanismos. Por una parte, el ADN metilado evitaría la transcripción de forma directa dado que algunos factores de transcripción generales como Sp1, CREB, E2F ó NF-κB se unen a dominios que contienen CpG, y esta unión disminuye cuando estos dominios están metilados. Por otra parte, mediante la interacción específica de represores transcripcionales con dominios de unión a dinucleótidos CpG metilados, llamados genéricamente proteínas MBP (“methyl-CpG binding proteins”), entre las que destacarían: MeCP2 (“methyl-CpG binding protein 2”), MBD1-4 (“methyl-CpG binding domain protein 1-4”) y Kaiso también conocida como ZBTB33 (“zinc finger and BTB domain containing protein 33”). Estas MBPs, a su vez, reclutarían proteínas modificadoras de histonas formando complejos proteicos que darían lugar al establecimiento de una cromatina de alto grado de compactación y, por tanto, se reprimiría la expresión génica ([8491]).

Las enzimas responsables de la metilación del ADN reciben el nombre de ADN metiltransferasas (DNMT), catalizando la transferencia de un grupo metilo del donador S-adenosil-L-metionina (SAM) hasta la posición 5' del anillo de la citosina, dando lugar a la

base 5-metilcitosina (5mC). En mamíferos, se han descrito 5 miembros de la familia DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L. Sin embargo, únicamente poseen actividad metiltransferasa DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Pese a esto, se ha descrito que DNMT3L actuaría como cofactor interaccionando con DNMT3a y DNMT3b y, a su vez, ejercería una función de represión epigenética al reclutar enzimas modificadores de histonas a las regiones promotoras metiladas ([8494], [8495]). Por otro lado, DNMT2 sería la responsable de catalizar la metilación del ARN de transferencia, evitando así su degradación por ribonucleasas. Por lo que respecta a DNMT1 ó metiltransferasa de mantenimiento, cabe decir que es la ADN metiltransferasa más abundante, cuya transcripción tiene lugar mayoritariamente durante la fase S del ciclo celular. Esta DNMT es la responsable de la metilación asociada al proceso de replicación del ADN, de forma que cataliza la metilación de las posiciones hemimetiladas generadas durante la replicación semi-conservativa del ADN. Esto es posible dado que interactúa con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que es la proteína encargada de anclar la ADN polimerasa a la horquilla de replicación. Por último, DNMT3a y DNMT3b, comúnmente llamadas metiltransferasas *de novo*, presentan afinidad por dinucleótidos CpG no metilados y, por tanto, son las responsables del establecimiento de los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario, encontrándose altamente expresadas en células embrionarias e infra-expresadas en células diferenciadas. Pese a esto, cada vez son más las evidencias que indicarían que DNMT1 podría jugar un papel en la metilación *de novo*, así como DNMT3a y DNMT3b podrían contribuir en la metilación de mantenimiento ([8496]).

Tal y como se ha comentado previamente, la metilación del ADN es una marca epigenética reversible, pudiendo ser restituida por procesos de pérdida de metilación o desmetilación del ADN. Se han propuesto mecanismos de desmetilación pasiva que implicarían la pérdida de metilación durante la replicación del ADN por inhibición de la acción de DNMT1 sobre la cadena hemimetilada. De este modo y, tras varios ciclos de replicación, se conseguiría eliminar la metilación del ADN de esa región genómica. Otros mecanismos alternativos para explicar la re-expresión de genes silenciados por metilación, sobretudo en células diferenciadas que carecen de replicación, implican el proceso llamado desmetilación activa (Figura 6).

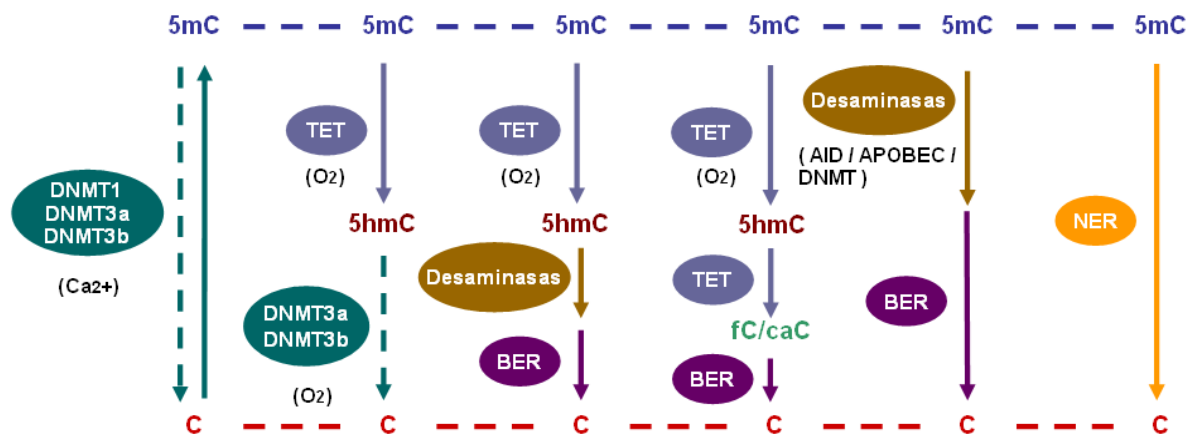


Figura 6. Mecanismos de desmetilación del ADN de forma activa. (Imagen modificada de [8497]).

Un elemento clave en este proceso son los miembros de la familia de proteínas TET (“Ten-eleven translocation”). Se conocen 3 miembros de esta familia (TET1, TET2 y TET3) capaces de oxidar la 5mC convirtiéndola en 5-hidroxi-metilcitosina (5hmC). Tanto la 5hmC, como la propia 5mC, podrían ser sustrato de distintos elementos enzimáticos, tales como desaminasas del complejo AID (“Activation-induced cytidine deaminase”)/APOBEC (“Apoprotein B mRNA-editing enzyme complex”) ó bien, podrían ser las propias enzimas TET las responsables de convertirlas en formil-citosinas (fC) y carboxil-citosinas (caC). En los tres casos, el proceso final implicaría la actuación del sistema de reparación por escisión de bases (BER), dando lugar a la citosina libre de grupo metilo. Por otro lado, hay evidencias que demuestran que las propias DNMT3a y DNMT3b podrían ejercer la función de agentes desmetiladores en situaciones de oxidación y de ausencia del donador de grupos metilos SAM, catalizando la conversión de 5hmC en citosina, posteriormente a la actuación del complejo TET. Del mismo modo, se ha descrito que tanto las DNMT *de novo* como DNMT1, podrían catalizar directamente la desmetilación de las 5mC en presencia de iones calcio y bajo condiciones no reductoras en ausencia de SAM. El último mecanismo de desmetilación activa, descrito hasta el momento, implicaría la actuación de la maquinaria de reparación del ADN comúnmente llamada NER (“Nucleotide excision repair”) ([8497]).

1.2 Modificación postraduccional de histonas

Las histonas son proteínas muy conservadas evolutivamente y responsables del empaquetamiento del ADN en el núcleo eucariótico formando la cromatina. Existen dos tipos de cromatina en función del grado de plegamiento, la eucromatina y la heterocromatina. La primera de ellas se caracteriza por estar ligeramente compactada y se sitúa en regiones génicas transcripcionalmente activas, mientras que la heterocromatina está formada por ADN altamente condensado y se asocia a silenciamiento génico. En ambos casos, la unidad básica es el nucleosoma que está formado por un segmento de 147 pb de ADN que se pliega alrededor de un octámero de histonas. Cada octámero está compuesto a su vez por dos moléculas de cada tipo de histona (H2A, H2B H3 y H4). No obstante, la función de las histonas no es únicamente estructural regulando el grado de plegamiento del material genético sino que, a su vez, participan en procesos de reparación del ADN, actividad transcripcional y replicación. Esto se debe a modificaciones covalentes postraduccionales que tienen lugar en las colas amino-terminales, las cuales tienen una repercusión directa sobre la conformación de la cromatina ([8498]), además de reclutar diferentes tipos de proteínas reguladoras (Figura 7).

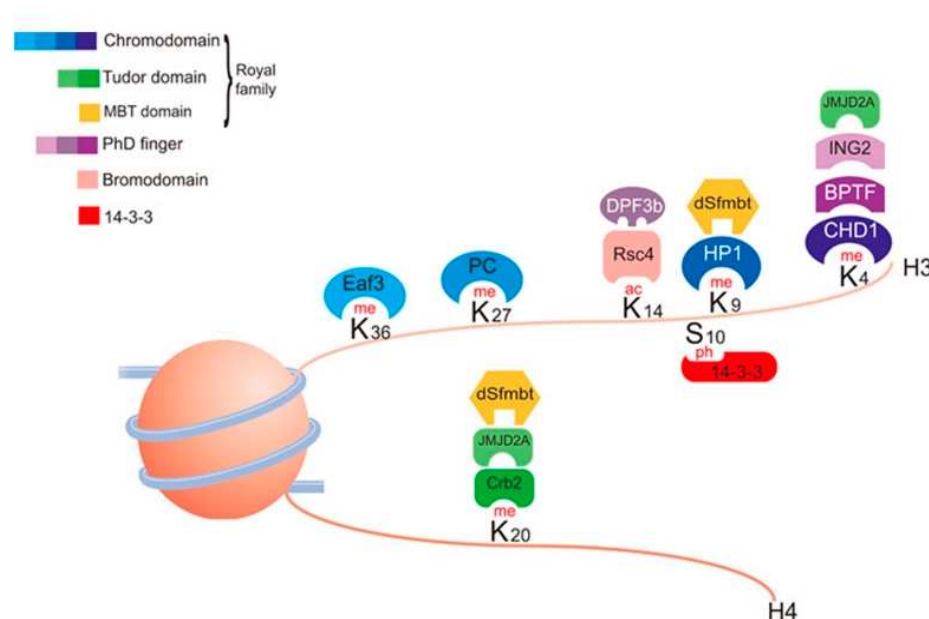


Figura 7. Imagen representativa de proteínas con dominios específicos de unión a modificaciones de histona. (Imagen extraída de [8500]). La metilación de histonas es reconocida mediante dominios del tipo “chromo-like” de la familia proteica Royal (chromo, Tudor y MBT) y dominios PHD. A su vez, la acetilación es reconocida por bromodominios y la fosforilación por dominios propios de las proteínas 14-3-3.

Existe una gran variedad de modificaciones de histonas que incluyen: acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, ribosilación e isomerización. Numerosos estudios investigan la relación de estas modificaciones con la dinámica de la cromatina y su repercusión sobre la transcripción génica. Tanto es así, que se ha postulado la existencia de un código de histonas ([8499]), de forma que una región genómica se comportará como eucromatina ó heterocromatina dependiendo de las modificaciones de las histonas presentes en dicha región. De modo general, se ha establecido que una región de eucromatina se caracteriza por presentar la lisina 4 de la histona 3 metilada (con uno, dos o tres grupos metilo), y las lisinas 9 y 14 de la misma histona acetiladas. La configuración que se obtiene con estas modificaciones permite la unión de complejos proteicos implicados en activación génica. Esta misma región puede convertirse en heterocromatina tras la metilación de la lisina 9 de la histona 3 y la pérdida de las anteriores modificaciones, favoreciendo el reclutamiento de factores de silenciamiento génico (Figura 7) ([8500]).

Por tanto, las modificaciones de las histonas influyen en la regulación de la expresión génica principalmente mediante dos mecanismos. Por una parte, afectando directamente la estructura de la cromatina derivando en una cromatina con distinto grado de empaquetamiento y, por otra parte, reclutando factores de unión a cromatina que ejercerán su función de reguladores transcripcionales. De este modo, se podrían clasificar las modificaciones de histonas en marcas activadoras y marcas represoras de la transcripción génica, tal y como se muestra en la Figura 8 ([8501]).

metilación resulta del balance entre enzimas histona metiltransferasas (HMT) y histona desmetilasas (HDMT). Los residuos de lisina pueden ser mono- di- ó tri-metilados y el efecto de tales modificaciones sobre la regulación génica depende tanto del aminoácido como del número de grupos metilo añadidos. A modo de ejemplo, serían marcas represoras de la transcripción génica H4K20me3 (tri-metilación de la lisina 20 de la histona 4) y H3K27me3 (tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3), mientras que H3K4me2 (di-metilación de la lisina 4 de la histona 3) actuaría como marca activadora de la transcripción (Figura 8) ([8501]).

1.3 Remodelación de la cromatina

La remodelación de la cromatina es una regulación epigenética que se produce mediante la acción de complejos multiproteicos de remodelaje dependientes de ATP que alteran la composición y distribución de los nucleosomas provocando, en último término, cambios en el grado de compactación de la cromatina ([8502]).

Se han descrito diversos mecanismos de acción de los remodeladores de la cromatina (Figura 9). Así, estos complejos multiproteicos pueden movilizar octámeros de histonas ya depositados, permitiendo la incorporación de nuevos octámeros e incrementando así el grado de compactación de la cromatina. Como consecuencia de este proceso se evitaría la unión de proteínas DBP (“DNA-binding protein”) a su secuencia diana, que quedaría oculta en la nueva disposición nucleosomal. Por el contrario, procesos como la reposición, la eyección ó el desplegamiento localizado de los nucleosomas permitirían la exposición de los sitios de unión de dichas proteínas DBP. Por último, la acción de los remodeladores puede implicar alteraciones en la composición del contenido de nucleosomas mediante el intercambio de dímeros por otros que contengan variantes de histonas, o por medio de la eyección del propio dímero ([8503]).

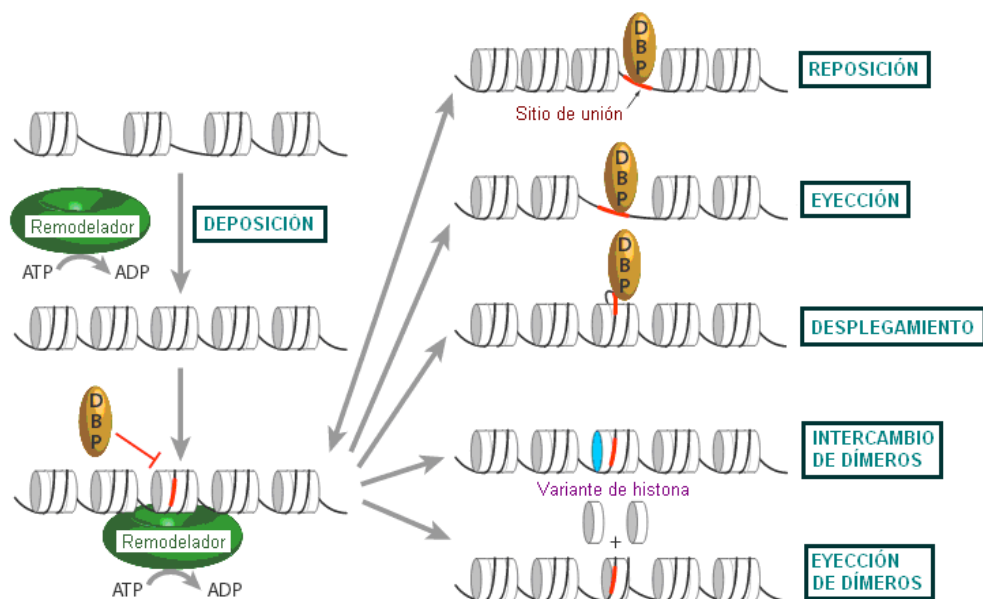


Figura 9. Mecanismos de acción de los complejos remodeladores de la cromatina.
(Imagen modificada de [8503]).

Existen diferentes enzimas remodeladoras clasificados en cuatro familias: SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80. El reconocimiento de los nucleosomas por parte de estas enzimas se produce por diversos mecanismos, entre ellos, mediante la interacción de dominios específicos de los complejos remodeladores con marcas concretas presentes en las histonas del nucleosoma, así como por otros mecanismos que implican desde el reconocimiento de secuencias ó estructuras concretas del ADN, hasta el reclutamiento por parte de factores de transcripción a regiones específicas del genoma ([8504]). Estos remodeladores están implicados en la regulación de diversos procesos como la transcripción génica, la replicación, la reparación o, incluso, en fenómenos de recombinación del ADN. Así, la familia SWI/SNF se ha asociado con relajación de la cromatina, mientras que los miembros de la familia ISWI se han relacionado tanto con la compactación, y consecuente represión transcripcional, como con la separación de los nucleosomas favoreciendo el acceso de la ARN polimerasa II ([8503]).

1.4 ARNs no codificantes

Durante décadas, el dogma central de la biología molecular propuso a las moléculas de ARN como mensajeros informativos entre el ADN y las proteínas. Sin embargo, tras el hallazgo de que únicamente el 2% del genoma humano codifica proteínas, se evidenció la

existencia del llamado genoma oscuro o no codificante. Fue en este ámbito en el que la investigación de los ARNs no codificantes (ncRNAs) adquirió relevancia, tanto es así que, actualmente, numerosos son los estudios basados en elucidar su implicación en la regulación del transcriptoma humano ([8505]). La mayoría de estos ncRNAs desempeñan funciones esenciales y ampliamente conocidas como el ARN ribosómico (rRNA) y el ARN de transferencia (tRNA), que participan en el proceso de traducción del ARN mensajero (mRNA) a proteína. Sin embargo, existe un amplio abanico de moléculas de ncRNAs agrupados según el tamaño del transcrito en: “long nc RNAs” (lncRNAs) formados por más de 200 nucleótidos y “small ncRNAs” compuestos por menos de 200 nucleótidos. Dentro de estos últimos, destacarían los “microRNAs” (miRNAs), los “small interfering RNAs” (siRNAs), los “small nucleolar RNAs” (snoRNAs) y los “PIWI-interacting RNAs” (piRNAs) ([8506]).

De todas las categorías de ncRNAs, los más ampliamente estudiados son los miRNAs, que están formados por entre 18 y 25 nucleótidos, conservados evolutivamente e implicados en la inhibición de traducción de mRNAs diana por complementariedad con su región 3' UTR ([8507]). Existen dos tipos de miRNAs en función de su localización genómica: intergénicos e intragénicos. Así, los genes de miRNAs localizados en regiones intergénicas (a más de 1kb de distancia de los genes adyacentes) son transcritos por la ARN polimerasa II a partir de su propio promotor. Sin embargo, los genes de miRNAs situados en regiones intragénicas, pudiendo ser exónicos ó intrónicos, presentan una transcripción dependiente del gen en el que se encuentran insertados, explicando así los fenómenos de especificidad tisular asociados a determinados tipos de miRNAs. En ambos casos, se obtienen transcritos primarios (pri-miRNAs) bicatenarios formados por una caperuza en 5' y una cola de poli-adeninas en 3' que son procesados por el complejo constituido por la endonucleasa Drosha y Pasha, encargadas de cortar las bases de la horquilla, formando estructuras cortas de 70 nucleótidos en forma de “hairpin stem-loop” llamadas pre-miRNAs. La exportina 5 es la responsable de transportar este pre-miRNA desde el núcleo al citoplasma, donde es fragmentado por la ribonucleasa Dicer, dando lugar a un miRNA de cadena doble de 20-25 nucleótidos de longitud final y con extremos 3' cohesivos llamado miRNA duplex. Las dos cadenas que constituyen el miRNA duplex se separan y únicamente la cadena “antisense” se incorpora al complejo ribonucleoproteico RISC (“RNA-induced silencing complex”) formando el conocido miRISC, que es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción proteica. El mecanismo de acción del miRISC dependerá del grado de complementariedad del miRNA con su diana, de forma que si la complementariedad con la región 3' UTR del mRNA es elevada o total derivará en su degradación, mientras que en caso

contrario, tendrá lugar la inhibición de la traducción ([8508]). A través de este mecanismo, los miRNAs controlan cientos de genes implicados en diversos procesos celulares y vías de señalización, tales como oncogenes o genes supresores tumorales ([8509]). Así, se han descrito un gran número de miRNAs que presentan una expresión aberrante y característica en determinadas patologías, incluyendo el cáncer de mama ([8510]).

1.5 Interacción de los componentes epigenéticos

Para garantizar el mantenimiento de un patrón epigenético característico y una regulación adecuada de la expresión génica, es necesaria la implicación de todos los componentes epigenéticos así como su correcta coordinación ([8512]). En este sentido, numerosas evidencias han mostrado la acción coordinada de la maquinaria de metilación del ADN y la responsable de las modificaciones postraduccionales de las histonas en la regulación de la expresión génica (Figura 10) ([8513]).

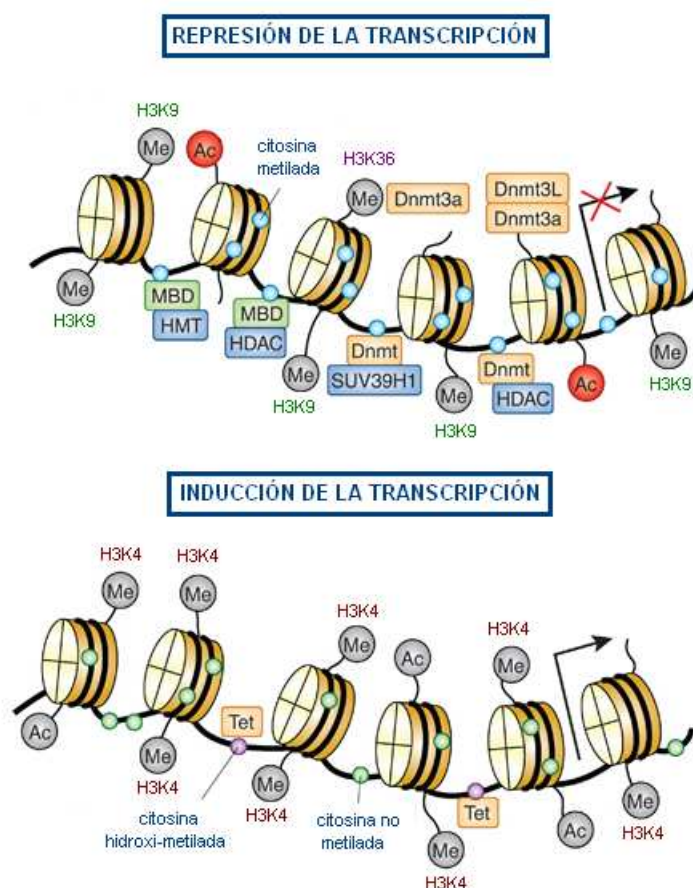


Figura 10. Esquema ilustrativo de la interacción entre elementos implicados en la metilación del ADN y la modificación postraduccionales de las histonas. (Imagen modificada de [8513]).

Esta interacción entre componentes epigenéticos sucede incluso en la etapa del desarrollo embrionario, durante el establecimiento del patrón de metilación del ADN, proceso que está mediado por modificaciones de histonas. De esta manera, el patrón de metilación de H3K4 (mono- di- ó tri-metilada) a lo largo del genoma se establece en el embrión antes de llevarse a cabo la metilación *de novo* del ADN. Esto es posible dado que la propia ARN polimerasa II es la encargada de reclutar enzimas HMT que específicamente metilan los residuos de la lisina 4 de la histona 3. En el embrión, la ARN polimerasa II se une mayoritariamente a islas CpG, de manera que únicamente esas regiones genómicas están marcadas por metilación de la H3K4, mientras que el resto del genoma contiene nucleosomas libres de tal modificación. Se ha descrito que el reclutamiento de DNMT3a y DNMT3b por los nucleosomas es inhibido por la presencia de metilación en H3K4, de forma que la metilación *de novo* tiene lugar en la mayoría de posiciones CpG, quedando excluidas las islas CpG ([8514]).

La interacción entre ambas maquinarias también sucede durante la replicación del ADN, momento en el que DNMT1 se asocia con PCNA y Uhrf1 en la horquilla de replicación para llevar a cabo la metilación de mantenimiento de la cadena sintetizada. Así, la proteína Uhrf1, que contiene dominios Tudor y PHD de unión a H3K9me3/me2 y dominios SRA de unión a ADN hemimetilado, es la encargada de reclutar DNMT1 y HMT para garantizar la correcta metilación y modificación a nivel de histonas de la nueva cromatina ([8515]).

Un elemento clave en la regulación de la transcripción génica a nivel epigenético son las proteínas MBP, que presentan dominios de unión a ADN metilado de regiones promotoras. Dichas proteínas son capaces de reclutar complejos proteicos que contienen enzimas modificadoras de histonas como HDAC y HMT, induciendo un incremento en el grado de empaquetamiento de la cromatina y la consecuente inhibición de la expresión génica ([8516], [8517], [8518]). Diversos estudios realizados “in vitro” demuestran que la inhibición de HDAC libera las proteínas MBP de citosinas metiladas, favoreciendo las condiciones para la transcripción ([8519]). Por otra parte, también se ha descrito que existen ciertas modificaciones de histonas capaces de mediar el reclutamiento de DNMTs con ayuda de proteínas intermediarias como sería el caso de HP1 (“heterochromatin protein 1”). Ha sido ampliamente demostrado que la metilación de H3K9, llevada a cabo por las histonas metiltransferasas G9a (H3K9me, H3K9me2) y SUV39H1 (H3K9me3), actúa como marca epigenética de unión a HP1 que es la encargada de reclutar DNMTs con la consecuente metilación del ADN de dicha región ([8520]). Además, estas DNMTs son capaces de reclutar HDAC que eliminarían los grupos acetilo de las histonas incrementando el grado de

empaquetamiento de la cromatina y restringiendo el acceso de la maquinaria de transcripción ([8521]).

Cabe destacar que la interacción entre la maquinaria epigenética no únicamente afecta a los componentes de la metilación del ADN y de las modificaciones postraduccionales de las histonas, sino que el resto de elementos epigenéticos también juegan un papel revelante en la regulación génica, formando una compleja red de interacciones (Figura 11). En este sentido, determinados ncRNAs regulan los niveles de las DNMTs mediante la inducción de su silenciamiento génico o por degradación de los mRNA. Existen evidencias de que miRNA-29 es capaz de degradar de forma directa el mRNA de DNMT3a y DNMT3b e indirectamente el de DNMT1 ([8522]). Por otro lado, tanto la metilación del ADN como los ncRNAs, pueden actuar en conjunción regulando la expresión génica, como sería el caso de lncRNA Kcnq1ot1 (“Kcnq1 opposite transcript 1”) que interacciona con DNMT1 reclutándola en regiones diferencialmente metiladas de genes improntados ([8523]). A su vez, este lncRNA promueve el silenciamiento génico mediante la interacción con HMT G9a y con elementos del complejo proteico Polycomb tales como PCR1 (“Polycomb repressive complex 1”) que cataliza la monoubiquitinización de H2AK119, y PCR2 (“Polycomb repressive complex 2”) que presenta actividad HMT (H3K9 y H3K27) y HDAC ([8524]). Además, algunos ncRNAs serían los encargados de reclutar complejos remodeladores de la cromatina a regiones específicas del genoma ([8525], [8526]) y, estos a su vez, podrían unirse a través de bromo- y cromodominios a determinadas modificaciones de histonas.

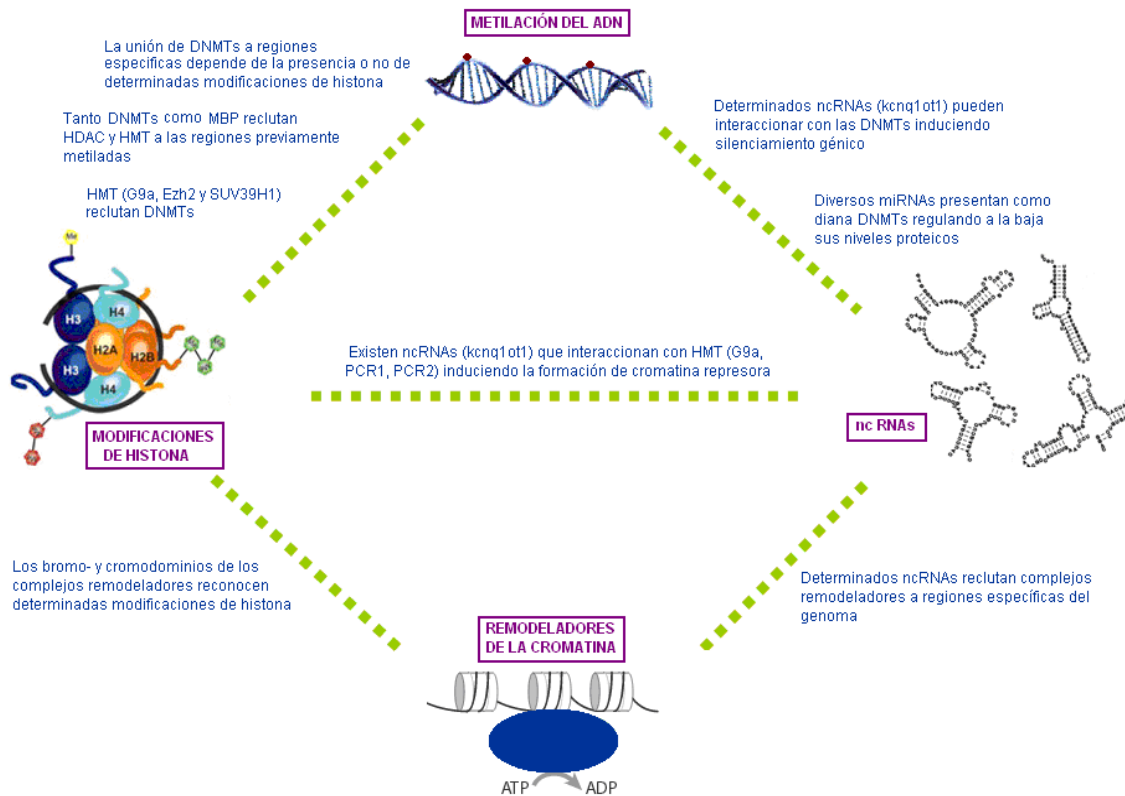


Figura 11. Esquema de las principales interacciones entre los componentes epigenéticos.

2. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER DE MAMA

Cada vez son más las evidencias que relacionan alteraciones de los patrones epigenéticos con la iniciación y progresión de diversas patologías, tales como defectos en el desarrollo, enfermedades neurológicas, cardiovasculares e inmunológicas así como en cáncer, incluyendo el cáncer de mama. La identificación de dichas alteraciones presenta un potencial uso clínico y, es por ello, que actualmente existen numerosos estudios basados tanto en la búsqueda de factores epigenéticos pronósticos y predictivos de ciertas patologías, como en el desarrollo de fármacos que permitan revertir tales aberraciones.

2.1. Metilación del ADN

Las alteraciones epigenéticas a nivel de metilación del ADN son las más ampliamente estudiadas, observándose que su distribución a lo largo del genoma no es uniforme. Por ese

motivo, es necesario diferenciar aquellas aberraciones en los patrones de metilación que tienen lugar a nivel global, de aquellas que afectan a regiones promotoras y, por tanto, ocurren a nivel gen-específico induciendo represión ó activación transcripcional.

2.1.1. Metilación global del genoma

En cáncer de mama, tal y como sucede en el resto de neoplasias, se ha descrito un descenso del grado de metilación global del ADN que acompaña al propio progreso tumoral, fenómeno denominado hipometilación global. En este sentido, las células tumorales pueden llegar a presentar una reducción de los niveles de 5mC genómica de aproximadamente el 20 - 60% en comparación con sus homólogas sanas ([8527]). Esta pérdida de grupos metilos es debida, principalmente, a la hipometilación del “cuerpo” de los genes, es decir, de las regiones codificantes e intrónicas, así como por la desmetilación de secuencias centroméricas repetitivas y elementos retrovirales transponibles integrados en el genoma ([8528]).

Las consecuencias funcionales del descenso de metilación en esas regiones serían: la promoción de fenómenos de inestabilidad cromosómica, la reactivación de elementos transponibles y, por último, la pérdida de impronta (LOI-“Loss of Imprinting”). Se ha descrito que la hipometilación del ADN podría favorecer la recombinación mitótica, derivando en la pérdida de heterocigosidad y promoviendo reordenamientos cariotípicos. A su vez, la desmetilación generalizada en secuencias centroméricas es una característica muy común en los tumores humanos, siendo de gran relevancia en la adquisición de aneuploidias. Así, han sido descritas numerosas aberraciones cromosómicas en pacientes con mutaciones germinales en DNMT3b. Otra de las consecuencias de la hipometilación global sería la reactivación de ADN parasitario intragenómico, como secuencias repetitivas tipo retrotransposones LINE (“Long interspersed nuclear element”) y SINE (“Short interspersed nuclear element”), entre las que destacan los elementos LINE-1 y Alu, respectivamente. Estas secuencias desmetiladas adquieren la capacidad de movilizarse a otras regiones genómicas, pudiendo alterar el patrón de expresión de genes relevantes para la funcionalidad celular, como sería el caso de genes supresores tumorales favoreciendo, de este modo, la progresión neoplásica ([8528]). Por último, la hipometilación global derivaría en pérdida de impronta, tal y como sucede con el gen IGF-2 (“Insulin-like growth factor 2”) ([8529]). En este caso, en condiciones fisiológicas, el alelo paterno es el único que se expresa, dado que el alelo materno está improntado. Sin

embargo, se ha descrito una alteración en la metilación del loci improntado permitiendo su expresión y asociándose con un mayor riesgo de cáncer de colon ([8530]).

La hipometilación global del genoma es un fenómeno temprano y común en numerosas neoplasias, incluyendo el cáncer de mama y, es por ello, que se ha considerado un evento característico (“hallmark”) del cáncer ([8531]). Pese a que se desconocen los mecanismos moleculares implicados en esta aberración epigenética, se han descrito diversas alteraciones que afectan a la maquinaria reguladora de la metilación del ADN y que podrían mediar esta desmetilación genómica. Existen numerosas evidencias de mutaciones de pérdida de actividad catalítica de componentes de la familia TET en neoplasias mieloides ([8532]) y de otros enzimas implicados en el proceso de desmetilación, así como mutaciones en genes codificantes de las propias DNMTs ([8533]).

2.1.2. Metilación gen-específica

En todos los tipos de cáncer se han descrito alteraciones de los patrones de metilación del ADN a nivel gen-específico que favorecerían el proceso neoplásico. Tales aberraciones estarían caracterizadas por la hipometilación de regiones promotoras de proto-oncogenes derivando en la activación de su expresión, y por la hipermetilación de genes supresores tumorales con su consecuente silenciamiento.

En cáncer de mama gran número de genes supresores tumorales están silenciados por hipermetilación, afectando cada una de las características adquiridas por las células neoplásicas, comúnmente llamadas “hallmarks” del cáncer ([3973], [7349]). Así, se ha descrito hipermetilación en genes implicados en la proliferación celular (BRCA1, ESR1 -RE_α -, PGR -RP-, RASSF1A, NES1, RAR β , p16, GSTP1), la adhesión e invasión (CDH1 -E-cadherina-, TIMP3), la apoptosis (TWIST) y la angiogenesis (MASPINA), entre otros (Figura 12) ([6609]).

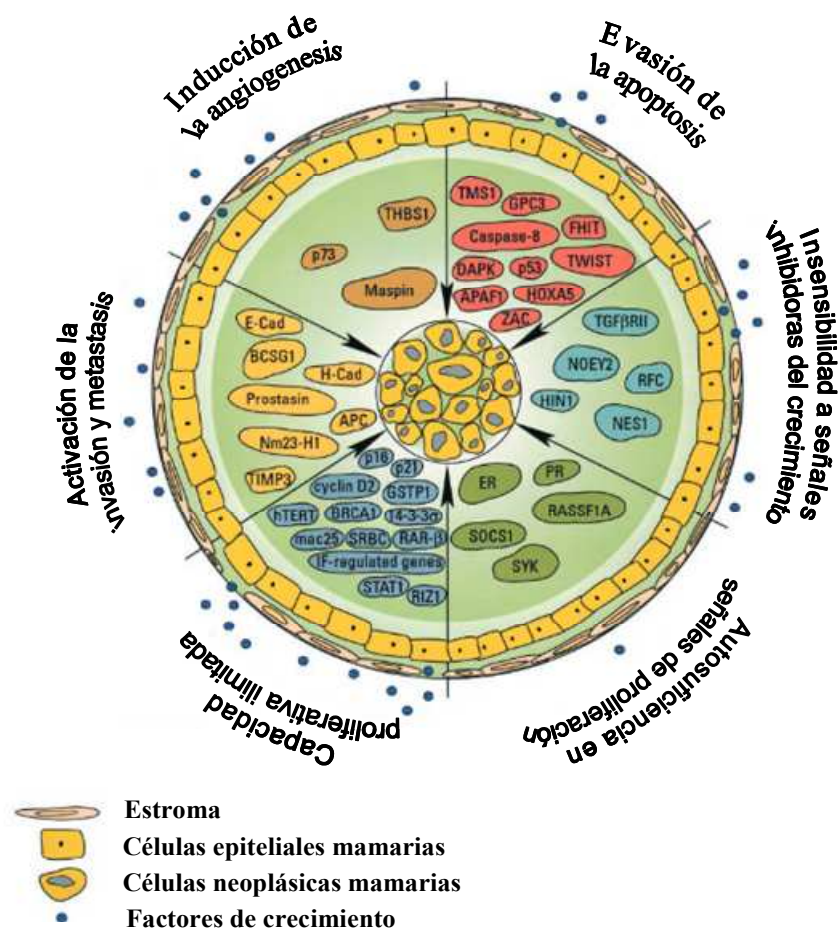


Figura 12. Genes frecuentemente metilados durante el transcurso del proceso carcinogénico mamario. (Imagen modificada de [6609]).

En los últimos años, se han establecido asociaciones entre subtipos de cáncer de mama, y otros parámetros clínicos de la carcinogénesis, y el estado de metilación gen-específica. En este sentido, existen genes cuya metilación está relacionada con el estatus de los receptores hormonales de estrógenos y progesterona ([8535]), así como otros asociados con la supervivencia libre de enfermedad ([8536]) y con la metástasis ([8537]). Todos estos hallazgos serían relevantes para el uso de los patrones de metilación gen-específica como marcadores pronósticos de cáncer de mama, más allá de las clasificaciones existentes basadas en técnicas inmunohistoquímicas y de expresión génica. Además, actualmente está en debate la utilización de marcadores epigenéticos predictivos de determinadas enfermedades, como el cáncer. Así, se ha descrito la presencia de células tumorales circulantes en muestras plasmáticas que reflejarían los perfiles de metilación de la masa tumoral, evidenciando la importancia de dichos perfiles en la detección temprana, diagnóstico, estadificación y seguimiento del tratamiento ([8538]).

Por otra parte, otro de los grandes retos de los estudios epigenéticos es elucidar los mecanismos responsables de estas alteraciones de la metilación gen-específica en cáncer. Se ha descrito una expresión génica coordinada entre las DNMTs (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) humanas en tejidos normales y una sobreexpresión en diversos cánceres ([8431]), incluyendo el de mama ([7021], [8539]). Además, existen evidencias que sugieren que DNMT3b sería la isoforma que ejercería el papel predominante en la carcinogénesis mamaria ([8540]). A su vez, diversos estudios han demostrado la correlación existente entre la inhibición de la actividad DNMT y la reducción de la tumorigenicidad debido al incremento de expresión génica de supresores tumorales, sugiriendo a las propias DNMTs como potenciales dianas terapéuticas. Tanto es así que, actualmente, existen diversas investigaciones en el desarrollo de fármacos inhibidores de dichos enzimas que permitan revertir estas aberraciones, como sería el caso de los análogos de nucleósidos 5-azacitidina (“5-aza”, Vidaza[®]) y 5-aza-2'-deoxicitidina (“5-aza-CdR”, Dacogen[®]), entre otros ([8541]). Estos compuestos se incorporan al ADN, en lugar de la citosina, durante el proceso de replicación reclutando las DNMTs de forma covalente y, por tanto, actuarían como agentes desmetilantes del ADN. Ambos agentes químicos han sido aprobados por la FDA (“Food and Drug Administration”) para el tratamiento de diversas patologías como el síndrome mielodisplásico, el mesotelioma maligno, el carcinoma nasofaríngeo e, incluso, el cáncer de mama, entre otras enfermedades ([8542], [8543], [8544], [8545]).

2.2. Modificación postraduccional de histonas

El perfil de las modificaciones postraduccionales de las histonas también sufre alteraciones durante el desarrollo de ciertas patologías, incluyendo el cáncer. En este sentido, en 2005 Fraga y colaboradores propusieron como “hallmark” del cáncer tanto la pérdida global de acetilación de H4K16 como de trimetilación de H4K20, presentando también una disminución de ambas modificaciones en regiones promotoras de genes supresores tumorales ([8419]). Sin embargo, existen numerosas alteraciones en modificaciones de histonas que serían específicas del tipo tumoral. Así, en cáncer de mama se ha descrito una reducción global de H3K4me2 y H3K9ac ([8546]), mientras que niveles bajos de H3K4me2 pero elevados para H3K9ac se han relacionado con cáncer de pulmón ([8547]). Es por ello que cada vez son más los trabajos que pretenden caracterizar patrones de modificaciones de histonas alterados en determinadas patologías, así como hallar marcas de histonas con

potencial uso clínico. En cáncer de mama, en concreto, se ha descrito una correlación entre el descenso de H3K4me₂, H3K27me₃, H4R3me₂ (dimetilación de la arginina 3 de la histonas 4) y H4K20me₃ y un peor pronóstico clínico y menor supervivencia ([8420], [8421]).

Los mecanismos epigenéticos responsables de tales aberraciones en los perfiles de histonas siguen siendo desconocidos. Sin embargo, existen evidencias de desregulaciones de los enzimas que catalizan estas modificaciones, como sería el caso de hMOF, encargada de llevar a cabo la acetilación de H4K16, y que estaría frecuentemente infra-expresada en meduloblastomas y en cáncer de mama ([8548]). Otro ejemplo sería la sobre-expresión de la histona metiltransferasa EZH2 en diversos tipos de cánceres, entre ellos próstata ([8549]), linfomas ([8550]) y mama ([8551]). Asimismo, se han descrito alteraciones en HDMT en varias neoplasias y, concretamente en cáncer de mama, se ha detectado un incremento en los niveles de KDM5A y una disminución de KDM3B, asociada con menor supervivencia libre de enfermedad ([8552]). Por todo ello, se están desarrollando agentes químicos con capacidad de modular la actividad de estos enzimas, siendo los inhibidores de HDAC los más ampliamente utilizados. En 2006, la FDA aprobó el llamado Vorinostat (Zolinza[®], suberoylanilide hydroxamic acid “SAHA”) como agente antineoplásico para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T. Otro inhibidor de HDAC sería la tricostatina A (TSA), capaz de revertir la expresión de genes supresores tumorales silenciados por hipermetilación en líneas celulares ([8553]), como sería el caso del gen ESR1 (codificante del RE_α) en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 ([8554]).

F. INFLUENCIA DE FACTORES NUTRICIONALES Y DE ESTILO DE VIDA SOBRE LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN CÁNCER DE MAMA

1. FACTORES NUTRICIONALES

Cada vez son más los componentes nutricionales que se están revelando como potenciales moduladores de la maquinaria epigenética, evidenciando así el carácter reversible de tales modificaciones y su influencia por factores ambientales. Así, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que los hábitos dietéticos y el estilo de vida durante la gestación y la adolescencia tienen un impacto en la salud del adulto mediante la modificación del perfil epigenético ([8555]). A su vez, estudios en modelos animales ([8557]) y estudios

epidemiológicos de intervención dietética durante la edad adulta ([8556]) han puesto de manifiesto la influencia de la nutrición sobre el epigenoma. En este sentido, se ha descrito que deficiencias dietéticas en donadores de grupos metilo (folato ó vitamina B₉, colina, betaina, metionina y vitaminas B₂, B₆ y B₁₂) alteran los patrones de metilación del ADN debido a que tales compuestos son necesarios para la formación de SAM y, por tanto, limitan la biodisponibilidad del sustrato de las DNMTs y HMTs ([8558]) (Figura 13). En estudios en humanos, por ejemplo, la deficiencia dietética de folato se ha relacionado con el desarrollo de múltiples neoplasias ([8559]) mediante diferentes mecanismos de acción entre los que destacarían, a nivel epigenético, la alteración de la metilación del ADN a nivel global ([8560]) y gen-específica ([8561]), y la inhibición enzimática de DNMT1 ([8562]). En este sentido, se ha descrito que los efectos del folato sobre el epigenoma pueden depender no únicamente de la cantidad ingerida, sino también del tejido en estudio y de la etapa de desarrollo del individuo ([8489]). Por otro lado, las dietas bajas en proteínas pueden dar lugar a la reducción de la disponibilidad del precursor de metionina llamado homocisteína (Hcy) y derivar en hipometilación del ADN ([8563]).

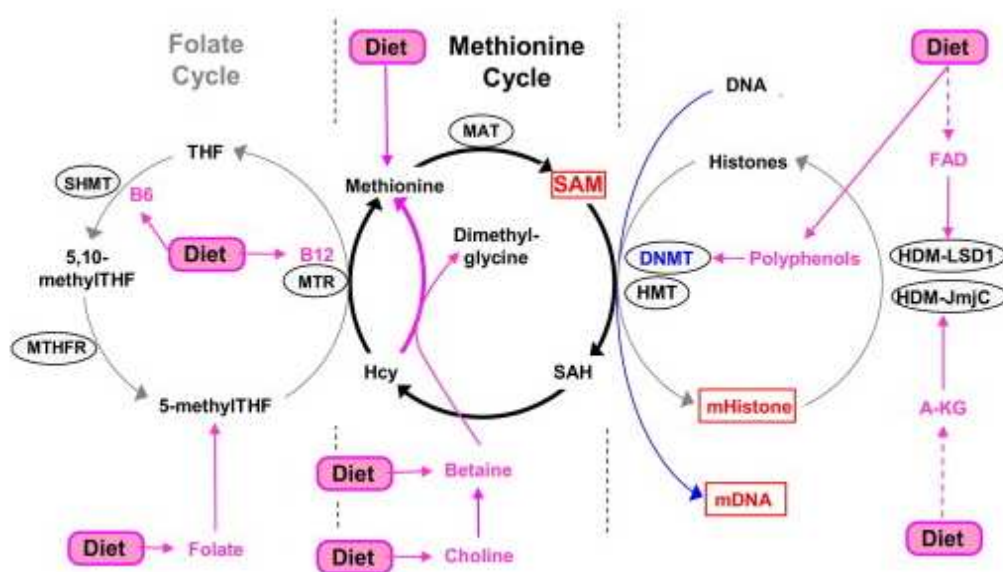


Figura 13. Influencia de factores nutricionales en la formación de SAM. (Imagen modificada de [8564]).

Otros componentes de la dieta con gran implicación en la regulación de la maquinaria epigenética son los polifenoles, compuestos que desempeñan un papel protector frente a diversas patologías y en la prevención del cáncer. Entre los polifenoles más relevantes se encontrarían la epigallocatequina-3-galata (EGCG), el resveratrol, la curcumina y la genisteína.

La EGCG, presente en el té verde, ejercería dichas funciones mediante diversos mecanismos de acción, entre los que destacarían a nivel epigenético, la inhibición de las DNMTs por interacción directa e indirecta ([8565]), promoviendo así la desmetilación y reactivación de la expresión de genes silenciados por metilación durante el transcurso de la patología. En este sentido, se ha descrito que la EGCG es capaz de reactivar la expresión de RE α en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 ([8566]). No obstante, este compuesto dietético también ejercería un papel como inhibidor de HAT con una especificidad generalizada hacia la gran mayoría de estas enzimas. A su vez, la EGCG podría modular la expresión de determinados miRNAs en células de carcinoma hepatocelular, mostrando la compleja red de interacciones existente entre componentes nutricionales y maquinaria epigenética ([8415]). Por lo que respecta al resveratrol, éste es capaz de revertir el silenciamiento epigenético de BRCA1 mediante la alteración de los patrones de modificaciones de histonas presentes en su región promotora ([8567]). Por otra parte, la curcumina, presente en el curri, ejercería funciones como inhibidor de HDAC y HAT. A su vez, se ha descrito que alteraría el perfil de expresión de ciertos miRNAs en células de cáncer de páncreas ([8415]). Por último, la genisteína, isoflavona presente en la soja, sería capaz de inducir la transcripción de genes supresores tumorales mediante la alteración de la acetilación de las histonas así como mediante cambios en los patrones de metilación del ADN de las regiones promotoras ([8568], [8569]). Además, se le atribuye un papel de regulador de la expresión de miRNAs en diversas líneas celulares neoplásicas ([8415]).

En el caso de los isotiocianatos, fitoquímicos presentes en las crucíferas con propiedades beneficiosas frente a diversos tipos de cáncer, también se han atribuido mecanismos epigenéticos a través de los que ejercerían tales funciones. En estudios realizados en líneas celulares de colon, próstata y mama, se ha descrito que este compuesto actúa como inhibidor de HDACs ([8570], [8571], [8572]) y, a su vez, es capaz de incrementar los niveles proteicos de p21 y Bax, promoviendo la parada de ciclo y la inducción de la apoptosis ([8570]). En este sentido, trabajos realizados en las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 han demostrado que el sulforafano inhibe la proliferación e induce apoptosis de manera dosis dependiente mediante la represión transcripcional del gen hTERT (“human telomerase reverse transcriptase”) ([8573]). Estos efectos estarían mediados, a su vez, por la inhibición de DNMTs y por el incremento de modificaciones postraduccionales de las histonas implicadas en activación transcripcional (H3K9ac y acetilación global de las histonas 3 y 4) y reducción de marcas represoras (H3K9me3 y H3K27me3) ([8573]). Estudios en humanos sanos sometidos a una ingesta de 68 gramos (equivalente a una taza) de brotes de brócoli, mostraron

una inhibición de la actividad de HDAC en las células mononucleares de sangre periférica entre 3-6 horas después de dicha ingesta. La actividad HDAC volvió a la normalidad tras 24 horas y la hiperacetilación de las histonas fue evidente durante 48 horas ([8574]).

Por otro lado, las propiedades anticancerígenas atribuidas al selenio podrían deberse, en parte, a su acción sobre la maquinaria epigenética. Estudios “in vitro” han demostrado que este compuesto es capaz de interferir con varios procesos epigenéticos promoviendo la reexpresión de genes supresores tumorales silenciados ([8575], [8576], [8577], [8578], [8579]). Así, en células de cáncer de próstata LNCaP se ha descrito que el selenio induce la expresión del gen p53 ([8575]) y, por otro lado, restaura la expresión de GSTP1 mediante la inhibición de la actividad HDAC y la disminución de la expresión de DNMTs, provocando a su vez un descenso en los niveles de metilación global del ADN ([8579]). Además, en la línea de adenocarcinoma humano HT29 se ha descrito que este compuesto actúa inhibiendo la expresión de DNMT1 probablemente mediante la interacción con la región reguladora AP-1 de DNMT1 ([8580]). Estudios “in vivo” e “in vitro” han puesto de manifiesto que la deficiencia dietética de selenio provoca también hipometilación global del ADN en hígado y colon de rata, así como en células humanas de cáncer de colon Caco-2 ([8576]). Por último, en un ensayo realizado en humanos se observó que los niveles plasmáticos de selenio estaban inversamente correlacionados con la metilación genómica del ADN en leucocitos ([8581]).

Otro compuesto con propiedades anticancerígenas es el licopeno, presente en diversas frutas y verduras. Sin embargo, son pocos los estudios basados en elucidar su influencia sobre el epigenoma. En este sentido, en células de cáncer de mama el licopeno reactivó la expresión de los genes supresores tumorales GSTP1 (“Glutathione S-transferase P1”), RAR β 2 y HIN-1 (“high in normal-1”) por desmetilación de sus regiones promotoras ([8582]). En células de cáncer de próstata, también se ha descrito la reactivación de la expresión del gen GSTP1 por desmetilación, estando asociada a una disminución de los niveles proteicos de DNMT3a ([8583]).

Por lo que respecta a los lípidos de la dieta, ha sido ampliamente demostrado el efecto de dichas grasas en la metilación de genes implicados en metabolismo ([8584], [8585], [8586]). Por ejemplo, en modelos murinos se ha relacionado alteraciones en el contenido de ácidos grasos ingeridos con modificaciones epigenéticas que afectan a la vía de síntesis de los PUFA. Estudios en ratones han revelado que una ingesta elevada de ácido α -linolénico durante el embarazo y la lactancia, aumenta el grado de metilación del promotor del gen de la desaturasa de ácidos grasos FADS2, tanto en el hígado de la madre como en el de los descendientes ([8584], [8585]). Además, en rata la exposición prenatal a diferentes ácidos grasos saturados y

PUFA n-3 de cadena larga indujo también hipermetilación del promotor del gen FADS2, y un descenso en los niveles del mRNA en hígado ([8586]). En un estudio epidemiológico, la suplementación con MUFA n-9 y PUFA n-3 alteró la metilación de las regiones promotoras de genes implicados en la biosíntesis de PUFA n-3 (FADS2 y ELOVL5) ([8587]). También se ha descrito un efecto de los lípidos de la dieta sobre genes relacionados con la obesidad o el control del apetito. Así, en modelos “in vivo” la ingesta de una dieta hiperlipídica prolongada produce cambios en el estado de metilación del gen de la leptina en tejido adiposo ([7312]) o del gen del receptor de 4 de melanocortina (MC4R) en cerebro ([8588]), provocando alteraciones en su expresión génica y regulando, de este modo, el apetito. Por otra parte, ha sido descrito que el ayuno disminuye los niveles globales de acetilación de H3 y H4 en células del hipotálamo ventromedial, mientras que la administración de dietas hiperlipídicas durante cuatro semanas incrementan la expresión de HDACs ([8589]). Sin embargo, y a pesar del efecto que los lípidos de la dieta ejercen sobre el cáncer de mama experimental, existen muy pocas evidencias de su influencia a nivel epigenético sobre genes relacionados con el cáncer. No obstante, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama se ha descrito que los PUFA n-3 están implicados en la disminución de la expresión de EZH2 mediante la inducción de su degradación a nivel postraducciona ([7152]). Por otro lado, los PUFA n-6 (ácido linoleico y araquidónico) no parecen ser reguladores de la expresión de tal enzima, sugiriendo que EZH2 es una diana específica de los ácidos grasos omega-3, pudiendo ser uno de los mecanismos a través de los que ejercerían efectos anticancerígenos ([8590]). El butirato es otro ácido graso que se ha manifestado como relevante en la regulación de la maquinaria epigenética. Éste es un ácido graso de cadena corta presente en verduras, legumbres, frutas y otros alimentos ricos en fibra, que ha demostrado “in vitro” ser capaz de inducir acetilación de las histonas mediante la inhibición de HDACs ([8570]) por interacción con su dominio catalítico ([8591]). En células de cáncer de colon humano Colo-320 este compuesto es capaz de activar la expresión del gen p21WAF1 aumentando la acetilación de las histonas 3 y 4 asociadas a su región promotora ([8592]). En un modelo murino de cáncer de colon, el butirato en combinación con el ácido fólico mostraron un efecto aditivo inhibidor de HDAC ([8593]). Por otro lado, en trabajos “in vivo” se ha observado un efecto de las dietas hiperlipídicas sobre el epigenoma. Así, en un modelo de xenoinjerto en ratón se demostró que el consumo de este tipo de dietas suprimía la expresión de p12 mediante el incremento de la expresión de HDAC favoreciendo la progresión tumoral ([7565]). En otro modelo murino de cáncer de mama metastásico se ha descrito un incremento en la metilación del promotor del gen supresor tumoral CDH1 (E-cadherina) y un descenso en su expresión tras alimentar a

dichos animales con dietas hiperlipídicas ([8594]). Por último, existen muy pocos trabajos en humanos que investiguen el efecto de los lípidos de la dieta en genes relacionados con el cáncer. Pese a ello, en un estudio epidemiológico se observó que el 45% de los individuos que seguían una dieta alta en grasas presentaban hipermetilación del gen supresor de tumores RAR β 2 en leucocitos, en comparación con los individuos alimentados con dietas bajas en grasas ([7003]).

2. ESTILO DE VIDA

A parte de los nutricionales, otros factores del estilo de vida también tienen una influencia relevante sobre los mecanismos epigenéticos. En este sentido, la actividad física confiere diversos beneficios frente a numerosas patologías, algunos de los cuales ocurren mediante alteraciones epigenéticas. Así, ha sido descrito que individuos con alta actividad física (30 min/día) presentan niveles superiores de metilación global del ADN en sangre periférica en comparación con individuos con baja actividad física (10 min/día) ([8595]). A su vez, en un estudio realizado en hombres se puso de manifiesto que tras 60 minutos de ejercicio, se producían cambios en los patrones de modificaciones de histonas asociados con remodelación de la cromatina y activación transcripcional en el músculo esquelético ([8596]). En ratas, una sola sesión de ejercicio en cinta rodante reduce la actividad HDAC, aumenta la actividad HAT e incrementa el balance HAT/HDAC en el hipocampo, sugiriendo que parte de los efectos neuroprotectores del ejercicio podrían ser mediados por mecanismos epigenéticos ([8597]). Por otro lado, la actividad física reduce el riesgo de cáncer de mama así como de otras neoplasias. En este sentido, ha sido descrito que realizar ejercicio durante al menos un año está inversamente relacionado con la hipermetilación del gen supresor tumoral APC en tejido mamario ([8598]). Sin embargo, los mecanismos a través de los que el ejercicio induce tales modificaciones epigenéticas son desconocidos.

La obesidad es otro de los factores relacionados con el estilo de vida e influidos tanto por la dieta como por la actividad física. Existen numerosos trabajos en humanos basados en elucidar la influencia de la obesidad sobre el epigenoma ([8599], [8600], [8601], [8602], [8603], [8604], [8605]). Dichos estudios emplearon el índice de masa corporal (IMC) o el porcentaje de grasa corporal para clasificar el grado de obesidad. Aunque la mayoría de éstos no encontraron asociación entre la obesidad y los niveles de metilación global en leucocitos de sangre periférica, algunos trabajos mostraron una disminución de la metilación global

relacionada a un aumento del IMC ([8606]), especialmente en asociación con bajas concentraciones de folato en plasma ([8607]). Por otro lado, se ha descrito una disminución de los niveles globales de H3K4me2 y un incremento de H3K4me3 en los adipocitos de individuos obesos ([8608]). A nivel gen-específico, existen diversos estudios que relacionan la obesidad con cambios en la metilación de genes improntados y otros implicados en control del apetito y metabolismo, vía de señalización de la insulina, inmunidad, crecimiento, etc. ([8609]). Por ejemplo, se ha descrito una menor metilación del gen TNF- α (“tumor necrosis factor alpha”) en leucocitos de mujeres obesas y una mayor concentración de dicho factor en plasma ([8610]), así como un incremento de metilación del gen POMC (“proopiomelanocortin”) en leucocitos de niños obesos ([8611]). Por lo que respecta al cáncer de mama, son escasos los trabajos basados en la influencia de la obesidad sobre el epigenoma. No obstante, en un estudio epidemiológico realizado en pacientes con cáncer de mama RE⁺ se asoció el IMC con un incremento de la metilación en tejido tumoral de genes implicados en respuesta inmune, proliferación y reparación del ADN ([8612]). Sin embargo, en mujeres postmenopáusicas no se observó relación entre el IMC y el grado de metilación en tejido tumoral de genes relevantes en este cáncer y descritos como frecuentemente metilados: p16, CDH1 (E-cadherina) y RAR β 2 ([8613]).

A parte de la obesidad, el hábito tabáquico y enólico también serían factores relacionados con el estilo de vida y con influencia sobre el desarrollo de ciertas patologías, entre ellas determinados tipos de cáncer. Así, en células de cáncer de pulmón expuestas a condensado de humo del tabaco, que contiene todas las sustancias carcinogénicas encontradas en los cigarrillos, se han descrito alteraciones en los niveles globales de modificaciones de histonas, en concreto, disminución de H4K16ac y H4K20me3, e incremento de H3K27me3 ([8614]). Por otra parte, en estudios en animales se ha descrito que el humo del tabaco es capaz de alterar en tejido pulmonar la expresión génica de DNMT1 y DNMT3b, e incrementar la metilación de genes supresores tumorales como RASSF1A y RAR β 2, frecuentemente silenciados por metilación en cáncer de pulmón ([8615]). En cuanto a la ingesta de alcohol, en leucocitos de pacientes alcohólicos se ha descrito una disminución de la metilación de secuencias repetitivas Alu ([8616]), así como un incremento en la metilación del gen HERP (“Homocysteine-induced ER protein”) ([8617]). En cáncer de mama, diversos estudios caso-control han mostrado la alteración de los patrones de metilación en tejido tumoral mamario de varios genes asociados al consumo de alcohol, incluyendo la hipermetilación de los genes ESR1 (RE α) ([8618]) y CDH1 (E-cadherina), y la hipometilación del gen p16 ([8619]).

Los contaminantes ambientales a los que la población está expuesta también parecen influir en el desarrollo de determinadas patologías mediante alteraciones del epigenoma. Estudios epidemiológicos y trabajos realizados en animales han establecido asociaciones entre la metilación del ADN y la exposición a factores como el benceno, el arsénico y el plomo, entre otros. Por lo que respecta al benceno, en leucocitos se ha descrito una disminución de la metilación de secuencias repetitivas tipo LINE-1 y Alu tras la exposición a este agente, así como un incremento de la metilación de genes supresores tumorales tales como p15 y p16 ([7455], [8620]), hipermetilación promovida también por la exposición a arsénico ([8621]). Por otro lado, la exposición a plomo también se ha asociado con un descenso de la metilación de secuencias tipo LINE-1 y Alu en leucocitos ([8622]). Además, existen insecticidas y pesticidas, tales como la permetrina, el metoxicloro y la vinclozolina que pueden actuar como disruptores endocrinos exógenos ejerciendo efectos sobre la maquinaria epigenética. En ratas, la exposición a estos agentes químicos durante el desarrollo gonadal embrionario se relaciona con la esterilidad masculina en el individuo adulto, mediada en parte, por alteración de la expresión de DNMTs y de la metilación de múltiples genes como H19, Gtl2, Meg3 y Peg1 en tejido testicular ([8623]). Por lo que respecta al cáncer de mama, se ha asociado la exposición a bisfenol-A (BPA), compuesto empleado en la fabricación de distintos tipos de plástico, con un incremento de la metilación del gen LAMP3 (“lysosomal-associated membrane protein 3”) en tumores RE⁺ ([8624]). En la línea MCF-7 (RE⁺) se ha descrito un aumento de la expresión de la histona metiltransferasa EZH2 tras el tratamiento con BPA, favoreciendo así la progresión tumoral ([8625]). Por otro lado, diversos estudios han relacionado la exposición a dioxinas como la TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) con un mayor riesgo de cáncer de mama, mediado en parte por la alteración de los patrones epigenéticos ([8626]). Así, en un estudio realizado en ratas gestantes expuestas a TCDD, se observó un incremento de la metilación del gen BRCA1 en el tejido mamario de los descendientes, incremento producido por una mayor asociación de DNMT1 a su región promotora ([8627]).

G. OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación que desarrolla el “Grup Multidisciplinari per a l’Estudi del Càncer de Mama” sobre “Lípidos de la Dieta y Cáncer de Mama”. Este trabajo se ha llevado a cabo en dos líneas de investigación: cáncer de mama humano y cáncer de mama experimental, con el fin de obtener datos a favor de la implicación de cambios en el epigenoma por parte de los lípidos de la dieta que pudieran modificar el grado biológico de malignidad de los tumores mamarios. El estudio en humanos se ha desarrollado a partir de muestras y datos obtenidos de mujeres sanas y de enfermas de cáncer de mama en estadios iniciales (I) y localmente avanzados (II y III). Por otra parte, el estudio experimental se ha llevado a cabo en el modelo de tumores mamarios inducidos en ratas hembra Sprague-Dawley con el carcinógeno químico DMBA.

Este objetivo general basado en determinar modificaciones de los patrones epigenéticos por efecto de los lípidos de la dieta en cáncer de mama se concreta en los siguientes objetivos específicos:

ESTUDIO EN HUMANOS

1. Caracterizar los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama mediante el análisis de parámetros reproductivos y antropométricos.
2. Caracterizar el estilo de vida y los hábitos dietéticos de las voluntarias sanas y de las pacientes con cáncer de mama.
 - 2.1 Analizar dichos hábitos a través de cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, de adherencia a la Dieta Mediterránea y de evaluación de la actividad física.
 - 2.2 Determinar marcadores bioquímicos en sangre periférica que reflejen la ingesta lipídica.
3. Realizar un estudio molecular epigenético en sangre periférica de voluntarias sanas y de pacientes de cáncer de mama, así como en glándula mamaria y tejido tumoral de

pacientes, con la finalidad de hallar patrones de significación biológica en el cáncer de mama humano.

- 3.1** Evaluar el grado de metilación global del genoma en los diferentes tejidos mediante el análisis de secuencias repetitivas del ADN de tipo LINE-1.
 - 3.2** Analizar el estado de metilación de genes implicados en las características adquiridas por las células tumorales (“hallmarks” del cáncer) en las muestras anteriormente mencionadas.
- 4.** Establecer asociaciones entre los datos moleculares obtenidos en los diferentes tejidos y los parámetros clínicos, de estilo de vida y nutricionales evaluados.

ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL

- 1.** Estudiar el efecto de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz (rica en PUFA n-6) y de aceite de oliva virgen extra (rica en MUFA n-9 y componentes bioactivos) administradas desde el destete o desde la inducción con el carcinógeno DMBA sobre la expresión de los genes supresores tumorales RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c en glándula mamaria y tumores experimentales.
- 2.** Investigar el efecto modulador de tales lípidos sobre la metilación del ADN en glándula mamaria y tejido tumoral, como mecanismo epigenético frecuentemente alterado en cáncer de mama.
 - 2.1.** Determinar el efecto de los lípidos de la dieta sobre el grado de metilación global del genoma.
 - 2.2.** Evaluar la influencia de las dietas experimentales sobre el estado de metilación a nivel gen-específico de RASSF1A y TIMP3.
 - 2.3.** Analizar la expresión génica de las isoformas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b, así como el grado de actividad enzimática ADN metiltransferasa total.
- 3.** Estudiar en los mismos tejidos la influencia de estas dietas hiperlipídicas sobre modificaciones postraduccionales de las histonas con un papel en la disrupción epigenómica en cáncer de mama.

- 3.1.** Determinar los niveles globales de histona 3 y de sus modificaciones (dimetilación de la lisina 4 -H3K4me2- y trimetilación de la lisina 27 -H3K27me3-), así como de histona 4 y de sus modificaciones (trimetilación de la lisina 20 -H4K20me3- y acetilación de la lisina 16 -H4K16ac-).
- 4.** Correlacionar los resultados moleculares entre sí, así como con los datos clínicos e histopatológicos de los tumores. Comparar y relacionar los resultados del estudio en humanos con los obtenidos en el modelo experimental.

En última instancia el objetivo de este estudio es el de proporcionar evidencias científicas de la influencia de factores de estilo de vida y nutricionales, especialmente en relación a los lípidos de la dieta, sobre las modificaciones del epigenoma que tienen lugar durante el proceso neoplásico mamario.

El conjunto de los resultados permitiría formular opiniones científicas acerca de la relevancia que los hábitos dietéticos y el estilo de vida pueden tener en relación a la promoción de la salud o al riesgo de enfermedad. Asimismo, estos estudios ayudarían a definir factores de riesgo y/o protectores a los que puede estar sometida la población a partir de sus hábitos alimenticios en cuanto al consumo de grasas. En consecuencia, este trabajo en su conjunto podría enmarcarse en el área de salud pública dentro del campo de la prevención secundaria, e incluso primaria, del cáncer de mama.

..... **MATERIAL Y MÉTODOS** ■

A. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

Este trabajo se ha desarrollado en dos líneas de investigación: cáncer de mama humano y cáncer de mama experimental. El estudio en humanos se ha llevado a cabo a partir de muestras y datos obtenidos de voluntarias sanas y de pacientes con cáncer de mama en diferentes estadios: inicial (I) y localmente avanzado (II y III). Por lo que respecta al estudio experimental, éste se ha basado en el modelo de cáncer de mama inducido en la rata Sprague-Dawley mediante el carcinógeno químico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). El diseño experimental se realizó con el objetivo de analizar los efectos de las dietas con alto contenido en MUFA n-9 ó PUFA n-6 sobre las diferentes etapas de la carcinogénesis mamaria.

1. ESTUDIO EN HUMANOS

1.1. Diseño y sujetos de estudio

Este estudio se ha llevado a cabo en colaboración con dos centros hospitalarios, el Servicio de Oncología Médica del Instituto de Oncología Corachan (IDOC) de Barcelona y el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Consorcio Sanitario de Tarrasa (CST). Todos los procedimientos empleados en dicho estudio fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínic de Barcelona (centro de referencia del IDOC-fecha de aprobación 7/4/2011-), así como por el CEIC del CST (fecha de aprobación 30/10/2013). Del mismo modo, todas las personas implicadas han sido informadas del objetivo del estudio, del procedimiento de obtención de muestras y del uso de las mismas, y han firmado un consentimiento informado.

La obtención de datos y muestras de las voluntarias sanas y las pacientes con cáncer de mama en estadios I se ha realizado en el CST, y los de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (II y III) se han obtenido en el IDOC. En ambos centros, las pacientes candidatas han sido aquellas en las que estaba prescrito la realización de una biopsia, con la que se ha realizado el estudio histopatológico, se han determinado factores pronósticos y predictivos, y marcadores empleados para la clasificación molecular del cáncer de mama: receptores hormonales, HER2, p53, Ki67, citoqueratinas 5, 6 y 17. De ambas poblaciones (voluntarias y pacientes) se ha obtenido una muestra de sangre periférica mediante punción

venosa con el sistema Vacutainer[®] en tubos con citrato sódico como anticoagulante. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos y se separaron y congelaron a -80°C el plasma y los elementos formes. De las pacientes con cáncer de mama se ha obtenido, además, una muestra de tejido mamario y una parte de la biopsia de tumor mediante aguja TruCut[®]. Estos tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenados a -80°C, y posteriormente transportados a la Unidad de Fisiología Médica de la UAB, donde se han mantenido a -80°C hasta su uso para el estudio molecular presentado en este trabajo.

Todos los datos personales de las voluntarias sanas y de las pacientes son confidenciales, según establece la “Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal -23750-” (BOE núm. 298, 14/12/1999). Así mismo, todas las muestras han sido identificadas de forma anónima y los resultados derivados son igualmente confidenciales.

Los **criterios de inclusión** establecidos para la selección de las participantes fueron los siguientes:

a) Voluntarias sanas:

- Mujeres sanas de edad igual o superior a 18 años.
- Sin ninguno de los supuestos de exclusión detallados más adelante.
- Antes de comenzar el protocolo es necesario el documento del consentimiento informado firmado.

b) Pacientes con cáncer de mama:

- Enfermas de cáncer de mama en estadio inicial (I) o localmente avanzado (II/III) con diagnóstico histopatológico.
- Edad igual o superior a 18 años.
- Estado funcional ECOG ≤ 2 (“Eastern Cooperative Oncology Group” – ECOG- escala de valoración de las capacidades funcionales del paciente oncológico).
- Buena reserva medular (neutrófilos >1500 células/mm³, paquetas >100000 células/mm³ y hemoglobina < 10 g/dl).
- Función renal adecuada o moderada: aclaramiento de creatinina > 30 ml/min., calculado según la fórmula de Cockroff - Gault o creatinina sérica ≤ 2 mg/dl o 177 μ mol/l x límite superior de la normalidad (LSN).
- Antes de comenzar el protocolo es necesario el documento del consentimiento informado firmado.

Por otro lado, los **criterios de exclusión** fueron:

- a) Voluntarias sanas:
 - Edad inferior a 18 años.
 - Con historial personal o familiar directo (familiares de primer grado) de patología mamaria maligna y/o otros cánceres hormono-dependientes.
 - Bajo cualquier tipo de tratamiento médico.
 - Padecer cualquier tipo de enfermedad.
 - Con cualquier situación social, familiar y/o psicológica que pueda interferir con el estudio.

- b) Pacientes con cáncer de mama:
 - Edad inferior a 18 años.
 - Diagnóstico previo de cáncer de cualquier localización.
 - Haber recibido cualquier tipo de tratamiento oncológico ya sea quimioterápico, hormonoterápico, radioterápico o bioterápico.
 - Padecer otras enfermedades o patologías graves:
 - Cardiopatías graves, hipertensión arterial no controlada o arritmias no controladas de alto riesgo.
 - Trastornos neurológicos o psiquiátricos graves que impidan al paciente entender u otorgar el consentimiento informado.
 - Infección activa no controlada.
 - Úlcera péptica activa.
 - Diabetes Mellitus inestable.
 - Insuficiencia renal o hepática.
 - Con cualquier situación social, familiar y/o psicológica que pueda interferir con el estudio.

1.2. Caracterización de los sujetos de estudio: parámetros reproductivos e histopatológicos

Tanto de las voluntarias sanas como de las enfermas de cáncer de mama se registraron en una base de datos más de 40 variables de la historia clínica. De las pacientes con cáncer de mama también se recopilaron más de 90 variables clínicas de la enfermedad relacionadas con

el diagnóstico, el tratamiento neoadyuvante, la cirugía, el tratamiento adyuvante, el seguimiento y/o la recidiva. Finalmente, se realizó una selección de las más relevantes para el presente trabajo, teniéndose en cuenta los siguientes parámetros de historia reproductiva (sanas y enfermas) e histopatológicos (enfermas):

- Edad
- Edad menarquia
- Estado ovárico
- Edad menopausia
- Número de embarazos
- Edad primera gestación
- Lactancia materna
- Grado tumoral
- Estadio tumoral
- Receptor de estrógenos
- Receptor de progesterona
- Clasificación molecular

Además, se seleccionó el hábito tabáquico, evaluado de forma categórica, como característica relevante del estilo de vida de las participantes.

1.3. Caracterización de los sujetos de estudio: estilo de vida

La caracterización de los hábitos dietéticos y del estilo de vida, tanto de las voluntarias sanas como de las pacientes con cáncer de mama, se ha realizado mediante cuestionarios: de frecuencia de consumo de alimentos, de adherencia a la Dieta Mediterránea y de actividad física. Todos estos cuestionarios se han obtenido siguiendo un protocolo establecido por el equipo investigador. Posteriormente, han sido analizados en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Navarra, mediante lectura óptica de los mismos, recaudando la información en una base de datos en formato SPSS. Los especialistas de dicho departamento son expertos en epidemiología nutricional, y han adaptado y validado los cuestionarios empleados en este trabajo. Paralelamente a los mencionados cuestionarios, se ha determinado la composición de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos como marcador molecular que refleja la ingesta lipídica.

1.3.1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

Los hábitos dietéticos han sido valorados mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, previamente validado en España ([3019], [7303]). Estos cuestionarios han permitido la evaluación de numerosas variables dietéticas (Anexo 1), a partir de las cuales se calculó la ingesta por día de los diferentes macro- y micronutrientes. Para este trabajo se realizó una selección de dichas variables dietéticas, teniéndose en cuenta finalmente el consumo de: energía total, hidratos de carbono, proteínas, lípidos totales, ácidos grasos saturados, poliinsaturados totales, omega 6, omega 3 de origen no marino, omega 3 de origen marino, aceite de oliva, fibra y vitaminas (B₂, B₆, B₉ y B₁₂). Por otro lado, a partir de estos cuestionarios también se cuantificó la ingesta de alcohol como variable importante del estilo de vida.

1.3.2. Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea

La evaluación de la adherencia a la Dieta Mediterránea se ha realizado mediante un cuestionario de 14 preguntas en el que cada una de ellas toma valores de 0 ó 1 (Anexo 2). De tal forma que el resultado fue el sumatorio de dichos valores, obteniéndose un valor categórico entre 0 y 14 ([7315], [7323]).

1.3.3. Cuestionario de actividad física

Para la valoración de la actividad física se ha empleado un cuestionario de frecuencia de práctica de actividades físicas (Anexo 3), basado en el empleado en el Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study ([7300], [7319]), cuya versión española ha sido validada ([7320]). Así, cada tipo de actividad física tenía asignados equivalentes metabólicos representando la energía empleada en dicha actividad respecto la del estado en reposo. A partir de las actividades semanales realizadas por cada individuo, se calcularon los equivalentes metabólicos a la semana (MET/semana).

En el cuestionario también se incluyeron algunos parámetros antropométricos, con los que posteriormente se calcularon el índice de masa corporal (IMC) y el índice cintura-cadera (ratio ICC).

1.3.4. Determinación de marcadores dietéticos

Como marcador molecular de la ingesta lipídica se determinó el perfil de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos, en muestras de elementos formes tanto de las voluntarias sanas como de las pacientes con cáncer de mama. Dicha determinación consistió en una separación previa de las membranas de los eritrocitos, seguida de la transesterificación directa de los ácidos grasos y su posterior análisis por cromatografía de gases.

La separación de membranas se realizó a partir de 150 μ l de concentrado de elementos formes, al que se le añadió 150 μ l de tampón NaCl-Na₂HPO₄ (140 mM NaCl / 5 mM Na₂HPO₄) a pH 7,4 (relación 1:1). El fosfato sódico de dicho tampón ayudó a eliminar el hierro de la hemoglobina, evitando así la degradación por oxidación de los ácidos grasos. Seguidamente, la suspensión de elementos formes se centrifugó a 2500 xg a +4°C durante 10 minutos, y el precipitado obtenido fue lisado con tampón Tris-HCl (5 mM) a pH 7,4 (relación 1:5). Una vez finalizada la hemólisis, se centrifugó la muestra a 20000 xg a +4°C durante 25 minutos. El sobrenadante fue eliminado por decantación y el precipitado, formado por las membranas, fue resuspendido en tampón de lavado Tris-HCl (5 mM) a pH 7,4 (relación 1:5). A continuación, la suspensión fue centrifugada a 20000 xg a +4°C durante 10 minutos. Dicho lavado con tampón Tris-HCl (5 mM) se repitió un total de tres veces, tal y como se ha indicado previamente. Finalmente, las membranas de eritrocitos fueron resuspendidas en 100 μ l de tampón Tris-HCl (5 mM) a pH 7,4 y conservadas a -80°C.

Tanto el proceso de transesterificación de los ácidos grasos presentes en las membranas aisladas como su análisis por cromatografía de gases, se realizaron en el servicio del “Departament de Tecnologia d’Aliments” de la “Universitat de Lleida”. Para ello, se realizó la transesterificación directa de los ácidos grasos siguiendo el método descrito por Lepage y Roy ([8456]). Se emplearon estándares puros para la correcta identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos detectados (Tabla 1). La cantidad de cada ácido graso presente en cada muestra se expresó en porcentaje respecto al total de ácidos grasos detectados, dichos porcentajes fueron calculados a partir de los valores obtenidos de las áreas bajo el pico del cromatograma resultante.

Tabla 1. Listado de los ácidos grasos analizados por cromatografía de gases para la determinación de marcadores dietéticos en el estudio en humanos.

	NÚMERO LIPÍDICO	NOMBRE
SATURADOS		
	C14:0	Ác. mirístico
	C15:0	Ác. pentadecanoico
	C16:0	Ác. palmítico
	C17:0	Ác. margárico
	C18:0	Ác. esteárico
	C20:0	Ác. araquídico
	C22:0	Ác. behénico
	C23:0	Ác. tricosanoico
	C24:0	Ác. lignocérico
MONOINSATURADOS		
CIS	c9-C16:1	Ác. palmitoleico
	c10-C17:1	Ác. margaroleico
	c9-C18:1	Ác. oleico
	c11-C18:1	Ác. vaccénico
	c11-C20:1	Ác. gondoico
	c13-C22:1	Ác. erúcico
	c15-C24:1	Ác. nervónico
TRANS	t9-C18:1	Ác. elaídico
POLIINSATURADOS		
OMEGA 6	c9,12-C18:2	Ác. linoleico
	c9,12,15-C18:3	Ác. γ -linoleico
	c11,14-C20:2	Ác. eicosadienoico
	c8,11,14-C20:3	Ác. diomo- γ -linolenico (DGLA)
	c5,8,11,14-C20:4	Ác. araquidónico
	c13,16-C22:2	Ác. docosadienoico
OMEGA 3	c9,12,15-C18:3	Ác. α -linolénico
	c5,8,11,14,17-C20:5	Ác. eicosapentanoico (EPA)
	c4,7,10,13,16,19-C22:6	Ác. docosahexaenoico (DHA)

2. ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL

2.1. Dietas experimentales

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

aspecto es de gran relevancia dado que la dieta constituye la variable experimental más importante de este estudio. Para poder asegurar que los resultados obtenidos se deben específicamente a las variaciones de la dieta es imprescindible que ésta sea equilibrada para la rata y que no contenga sustancias que afecten la carcinogénesis mamaria. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 2, y en las Tablas 3 y 4 se indica la composición de los aceites utilizados.

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

	m3	M20	mO20
PROTEÍNAS			
Caseína	18,0	23,0	23,0
CARBOHIDRATOS			
Dextrosa	67,9	45,9	45,9
LÍPIDOS			
Aceite	3g aceite de maíz	20g aceite de maíz	3g aceite de maíz 17g aceite de oliva virgen extra
FIBRA			
Celulosa	5	5	5
SALES			
K ₂ HPO ₄	1,6100000		
CaCO ₃	1,2322576		
CaHPO ₄ ·1H ₂ O	1,0630714		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0000000		
NaCl	0,8350000		
C ₆ H ₅ O ₇ FeNH ₄	0,1130148		
MnSO ₄ ·1H ₂ O	0,0255000		
ZnCl	0,0072964		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0039294		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0002500		
KI	0,0000641		
TOTAL SALES	5,8903837	5,8903837	5,8903837
VITAMINAS			
E	0,0227273		
A	0,0014000		
K	0,0001000		
D3	0,0000031		
Colina	0,1800000		
Inositol	0,0150000		
C	0,0075000		
Ácido nicotínico	0,0060000		
Pantotenato	0,0040000		
B1	0,0010000		
B2	0,0010000		
B6	0,0010000		
Ácido fólico	0,0005000		
Biotina	0,0001000		
B12	0,0000050		
TOTAL VITAMINAS	0,2403354	0,2403354	0,2403354

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

Tabla 3. Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados en el estudio en el modelo experimental.

PARÁMETRO	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
C16:0 (palmitico)	11,1	13,2
C16:1 (palmitoleico)	0,2	1,3
C17:0 (margarico)	0,1	0,1
C17:1 (margaroleico)	-	0,2
C18:0 (esteárico)	2,3	2,5
C18:1 trans (elaídico)	0,1	-
C18:1 (oleico)	31,7	73,7
C18:2 trans (isómeros linoléicos)	1,3	-
C18:2 (linoleico)	51,3	7,3
C18:3 trans (isómeros linolénicos)	0,3	-
C18:3 (linolénico)	0,5	0,8
C20:0 (araquidónico)	0,5	0,4
C20:1 (gondoico)	0,2	0,3
C22:0 (behénico)	0,2	0,1
C24:0 (lignocérico)	0,2	0,1
RESUMEN ÁCIDOS GRASOS (%)		
Saturados	14,4	16,4
MUFA	32,1	75,5
PUFA n-6	51,3	7,3
PUFA n-3	0,5	0,8
Isómeros trans	1,7	-

Tabla 4. Otros compuestos analizados de los aceites utilizados en el estudio en el modelo experimental.

PARÁMETRO	ACEITE DE MAÍZ	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA
COMPOSICIÓN ESTERÓLICA		
(respecto al total de esteroides)		
Esteroides totales (mg/Kg)	7758	1639
Colesterol (%)	0,2	0,1
Brassicasterol (%)	-	-
24-metilen colesterol (%)	1,2	0,2
Campesterol (%)	16,5	2,6
Campestanol (%)	1,6	0,1
Estigmasterol (%)	6,0	0,8
Delta-7-campesterol (%)	0,2	-
Clerosterol (%)	0,8	1,3
Beta-sitosterol (%)	62,6	88,2
Sitostanol (%)	4,3	0,7
Delta-5-avenasterol (%)	4,0	5,0
Delta-5,24-estigmastadienol (%)	0,5	0,5
Delta-7-estigmastanol (%)	1,1	0,3
Delta-7-avenasterol (%)	1,0	0,2
ALCOHOLES (mg/Kg)		
Alcoholes grasos alifáticos	176	663
Alcoholes triterpénicos	3919	9164
Eritrodiol (dialcohol triterpénico)	12	20
TOCOFEROLES (mg/Kg)		
Alfa-tocoferol	380	232
Beta-tocoferol	12	4
Gamma-tocoferol	1201	28
Delta-tocoferol	45	-
Alfa-tocotrienol	116	-
Gamma-tocotrienol	38	-
HIDROCARBUROS (mg/Kg)		
Hidrocarburos esteroideos	940	-
Escualeno	485	5745
PIGMENTOS CLOROFÍLICOS		
Feofitinas (mg/Kg)	-	16,1
CAROTENOS (mg/Kg)		
Beta-caroteno (mayoritario)	1,2	7,0
COMPUESTOS FENÓLICOS (mg/Kg)		
Hidroxitirosol (HTy)	-	17,0
Tirosol (Ty)	-	11,8
Ácido vanílico	-	0,4
Vanilina	-	0,2
Ácido p-cumárico	-	0,4
Ácido ferúlico	-	1,6
Acetato hidroxitirosilo	-	6,9
Acetato tirosilo	-	3,7
Forma dialdehídico del aglucón de la decarboximetil-oleuropeína (derivado del HTy)	-	37,6
Forma dialdehídica del aglucón del decarboximetil-ligustrósido (derivado del Ty)	-	33,2
Forma aldehídica del aglucón de la oleuropeína (derivado del HTy)	-	38,2
LIGNANOS (mg/Kg)		
Pinoresinol	-	3,1
Acetoxipinoresinol	-	8,0
FLAVONAS (mg/Kg)		
Luteolina	-	10,0
Apigenina	-	4,3

2.2. Diseño experimental

El estudio experimental se ha realizado con las muestras obtenidas previamente en el laboratorio de ratas hembra Sprague-Dawley (Charles River Lab.; cepa Crl:OFA(SD), L'Arbresle Cedex, Francia). El cuidado de los animales y el establecimiento cumplieron las normas del Real Decreto 1201/2005 y la legislación Autonómica, el Decreto 214/1997, sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH 566/3616).

La serie experimental se desarrolló con el objetivo de estudiar el efecto de los lípidos de la dieta en los diferentes estadios de la carcinogénesis, y contenía 5 grupos experimentales y 167 animales en total. Todos los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, el día 22-23 de vida. El día posterior a su llegada, 6 animales fueron sacrificados y el resto fueron distribuidos en 5 grupos experimentales: los grupos Control (C), Mp y Op de 29 animales cada uno y los grupos Mip y Oip formados por 37 animales cada uno. A partir de ese día y hasta el final del ensayo, se les administraron las distintas dietas experimentales, m3, M20 ó mO20. Tal y como se muestra en la Figura 14, los animales del grupo Control (C) recibieron dieta normolipídica durante todo el ensayo, mientras que los animales de los grupos Mip y Oip recibieron dieta M20 y mO20, respectivamente. Estos dos grupos fueron diseñados para estudiar los efectos del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra, sobre la iniciación y la promoción de la carcinogénesis mamaria. Los animales de los grupos Mp y Op fueron alimentados con dieta m3 desde el destete hasta la inducción con el carcinógeno (día 53 de edad), y a partir de este día con dieta M20 y dieta mO20, respectivamente. Estos grupos se diseñaron para estudiar los efectos de las dietas de aceite de maíz y aceite de oliva virgen extra sobre la etapa de la promoción del cáncer de mama.

Todos los animales fueron inducidos el día 53 (día 0 del tiempo post-inducción) por instilación buco-gástrica con una dosis única de 5mg de DMBA. La inducción carcinogénica se realizó según el método de Huggins C *et al.* ([439], [443]) modificado ([1299]). Como el carcinógeno se administró vehiculizado en un lípido, a fin de evitar problemas de absorción, los animales de los grupos Mip y Oip recibieron dieta normolipídica durante dos días antes y un día después de la inducción. Por el mismo motivo, a los animales de los grupos Mp y Op no se les administraron las dietas hiperlipídicas hasta el día después de la inducción (día 54).

En los días 24, 36, 51, 100 y 246 (edad media al final del estudio) se sacrificó a los animales. Tal y como se ha comentado, y debido a que a los 24 días aún no había diferencias entre los

animales, se procesaron 6 con independencia de los grupos experimentales. A los 36 y 51 días de edad se sacrificaron 6 animales de cada condición experimental: Control (dieta normolipídica-grupos C, Mp, Op-), Mip y Oip. A la edad de 100 días, se procesaron 5 animales de cada grupo y el final del estudio coincidió con el procesamiento del resto de los animales (20 por grupo). No se sacrificó más de una rata por caja y día para evitar el estrés generado por la denominada “sensación inminente de peligro” que se produce en el resto de los animales de la misma caja ([1310], [6864]). Inmediatamente después del sacrificio de cada animal, se procedió a la necropsia y la obtención de las muestras biológicas de interés para este trabajo (tejido glandular mamario y tejido tumoral), así como otras necesarias para diferentes líneas de investigación del laboratorio. Los tejidos fueron lavados en suero fisiológico y rápidamente congelados en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C.

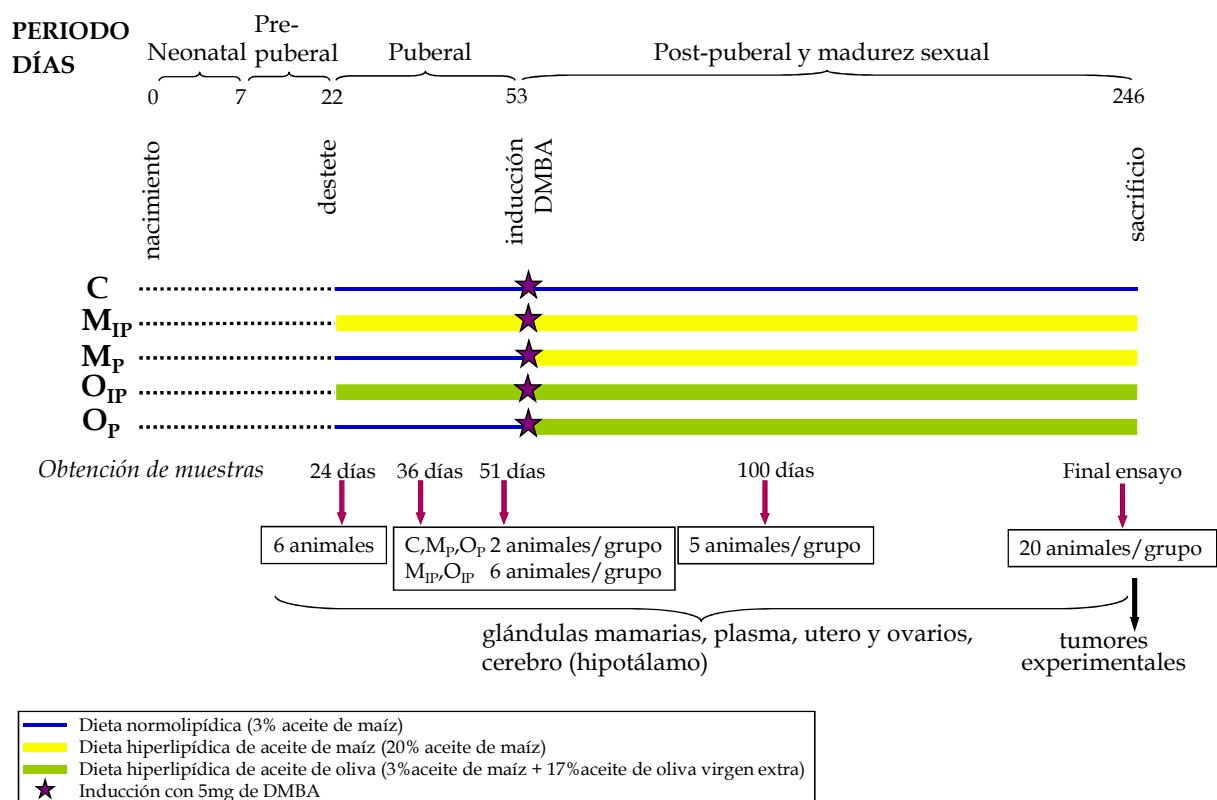


Figura 14. Diseño experimental del estudio en el modelo murino.

El estudio histopatológico de los tumores se realizó en colaboración con un médico especialista en anatomía patológica. El diagnóstico de las biopsias tumorales se basó esencialmente en los criterios de Young y Hallowes ([1141]) incluyéndose, en el presente trabajo, únicamente los adenocarcinomas mamarios. Así, se analizó el grado arquitectural y

nuclear de los adenocarcinomas (Grados I-III) como expresión de su diferenciación morfológica, y el número de mitosis en 10 campos de gran aumento (400X) como muestra de la capacidad proliferativa. El número de mitosis se contabilizó en valor absoluto (“Mitosis”) y agrupado en 5 categorías (“Mitosis Score”): ≤ 3 , 4-6, 7-9, 10- <20 y ≥ 20 mitosis. Estos parámetros permitieron valorar el grado histológico basado en el método de Scarff-Bloom-Richardson utilizado en los carcinomas de mama humanos (“SBR3”), adaptado a la rata (“SBR11”) por el equipo investigador ([4264]). Además, se calculó el volumen tumoral de los adenocarcinomas a partir de los 3 diámetros mayores (D1, D2 y D3) de cada tumor, aplicando la fórmula del volumen del elipsoide de revolución: $V = 4/3\pi \times D1/2 \times D2/2 \times D3/2$.

B. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

MATERIAL:

- Autoclave “SterilClav-75 Dry” (Raypa).
- Cabina de Flujo Laminar Vertical “FLV60” (Euro Aire-Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A.).
- Microcentrífuga 5415R (Eppendorf).
- Microcentrífuga “Microcentrífuga™ 11” (Beckman).
- Centrífuga refrigerada “Sorvall® RC-6” (DuPont Instruments).
- Horno de hibridación (Ecogen).
- Estufa incubadora (Mettler).
- Equipo de calibración de pH “GLP21” (Crison).
- Equipo de homogenización de tejidos “Polytron” (Kinematica).
- Equipo de “Real-Time PCR” MyiQ5-iCycle (BioRad Laboratories).
- Espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).
- Lector de placas “Infinite® M200 NanoQuant” (Tecan).
- Termociclador “Techne” (Progene).
- Termociclador C1000 (BioRad Laboratories)
- Pirosecuenciador “PSQ HS 96 Pyrosequencing System” (Biotage Inc.).
- Sonicador “Ultrasonic Homogenizer 3000” (Biologics Inc.).
- Unidad de electroforesis “Mini-PROTEAN® 3 Cell” (BioRad Laboratories).

- Fuente de alimentación electroforética “Power Pac Basic” (BioRad Laboratories).
- Sistema de transferencia electroforética “Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System” (BioRad Laboratories).
- Sistemas de captura de imágenes en tiempo real: “Gel Doc 2000” y “ChemiDoc[™] XRS+” (BioRad Laboratories).
- Programas de análisis de imagen: “Quantity One[™]” y “Image Lab[™] Software version 5.1” (BioRad Laboratories).
- Otro material: Congelador de -80°C “Ultima II” (REVCO), combinado de nevera de +4°C y congelador de -20°C (Liebherr), agitadores magnéticos y orbitales, vórtex, máquina de hielo, balanza de precisión, horno microondas, baños con control de temperatura, cubetas de electroforesis horizontales, bandejas y peines de electroforesis.

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

1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE METILACIÓN DEL ADN

1.1. Obtención y modificación de ADN total

1.1.1. Extracción y purificación de ADN total

Para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre periférica de voluntarias sanas y pacientes con cáncer de mama se utilizó el kit “SpeedTools DNA Extraction” (Biotools). A su vez, para las muestras de tejido mamario y tumor tanto de las pacientes con cáncer de mama como de los animales de experimentación se empleó el kit “SpeedTools Tissue DNA Extraction” (Biotools). Ambos kits se basan en un sistema de unión del ADN a una membrana de partículas de sílica.

Para las muestras de sangre periférica (200 µl de concentrado de elementos formes), el sistema consistió en una lisis en presencia de proteinasa K y una solución de hidrócloruro de guanidina a +70°C durante 30 minutos. En el caso de los tejidos, se realizó una pre-lisis de una porción de las biopsias (glándula mamaria y tumor humanos) ó de 25 mg (glándula mamaria o tumor de rata) con proteinasa K y SDS a +56°C durante 17 horas. Seguidamente, se realizó una lisis mediante hidrócloruro de guanidina a +70°C durante 10 minutos. En

ambos casos, el ADN fue unido a la membrana de la columna, posteriormente lavado, y recuperado por elución con una solución de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino (5 mM Tris-HCl pH 8,5).

La cuantificación y pureza del ADN obtenido se realizó a partir de 2 μ l de muestra utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). En el estudio en humanos, el rendimiento varió en función del tamaño de la biopsia y del tipo de tejido, obteniendo un valor aproximado de 5 μ g ADN/200 μ l de sangre periférica y entre 1-5 μ g ADN/porción de biopsia mamaria ó tumoral. En el estudio en el modelo experimental se obtuvo un rendimiento medio de aproximadamente 2 μ g ADN/mg de tejido glandular mamario y de 5 μ g ADN/mg de tejido tumoral. La pureza de los ácidos nucleicos fue determinada por espectrofotometría, mediante la relación D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀. Valores entre 1,8 y 2,0 indican una muestra pura, valores inferiores a 1,8 revelan contaminación de la muestra con proteínas, mientras que valores por encima de 2,0 indican presencia de oligonucleótidos y nucleótidos libres. Por otro lado, un valor de D.O.₂₆₀/D.O.₂₃₀ por encima de 2,0 en el caso del ARN o de 2,2-2,4 en el del ADN, indican también contaminación con proteínas, fenol o tiocianato de guanidina.

La integridad del ADN extraído se comprobó por electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó ADN Lambda HindIII (New England Biolabs, Inc.) como marcador de peso molecular. Los geles y las muestras se prepararon según Sambrook *et al.* ([2648]). Se utilizó TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) como tampón de electroforesis. Se prepararon minigeles al 1% de agarosa de 7 x 10 cm y un grosor de 2-3 mm y se aplicó un voltaje de 60 V durante 30 minutos. El ADN fue diluido en agua bidestilada estéril y se le añadió 1/6 parte del volumen de tampón de carga de ADN (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol). La visualización del ADN se consiguió por tinción con el agente intercalante bromuro de etidio que se incorporó directamente en el gel a una concentración final de 0,5 μ g/ml. La imagen conseguida por transiluminación fue captada por el sistema Gel Doc 2000 (BioRad Laboratories) con iluminación del gel con luz ultravioleta y utilizando el programa Quantity One™ (BioRad Laboratories).

1.1.2. Modificación del ADN por bisulfito sódico

El bisulfito sódico (NaHSO₃) es un compuesto químico de gran relevancia en estudios epigenéticos debido a su capacidad de convertir los residuos de citosinas no metiladas del

ADN en uracilos mediante un proceso de desaminación (Figura 15). Las citosinas metiladas son resistentes a dicha reacción y, por tanto, permanecen como citosinas tras la acción del bisulfito sódico. Durante la amplificación por PCR, el residuo de uracilo se amplifica como timina mientras que las citosinas metiladas permanecen como citosinas. De este modo, se produce un cambio en la secuencia de ADN permitiendo así discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas.



Figura 15. Imagen de la conversión de los nucleótidos de citosina durante la modificación del ADN por bisulfito sódico. (Imagen modificada de [8802]).

En el estudio en humanos, la modificación por bisulfito sódico se realizó mediante el kit “EpiTect[®] Bisulfite” (Qiagen), basado en un sistema de modificación y purificación de secuencias de ADN de hebra simple (single-stranded). La conversión se realizó en muestras de ADN total extraído de sangre periférica de voluntarias sanas y de pacientes con cáncer de mama, así como de glándula mamaria y de tejido tumoral de pacientes. Para ello, 500 ng-1 μg de ADN total de cada muestra fue llevado a un volumen final de 20 μl , al que se añadieron 85 μl del reactivo de bisulfito sódico. Para evitar la fragmentación del ADN durante la reacción de conversión que puede producirse debido a las altas temperaturas y a la acidificación del medio, se añadieron 35 μl de un tampón protector. La reacción de modificación se llevó a cabo en el termociclador Techno (Progene) siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial. Tras la modificación, el ADN fue purificado empleando columnas con membrana de sílica. Para aumentar la eficiencia del proceso, se utilizó un “ARN acompañante” junto con un tampón de tiocianato de guanidina que facilitaron la unión del ADN a la membrana. Posteriormente, el ADN unido a dicha membrana, fue lavado, desulfonado y eluido en un volumen final de 40 μl . Todas las muestras de ADN modificado fueron almacenadas a -20°C .

Por otro lado, en las muestras experimentales la modificación por bisulfito sódico se realizó mediante el kit “CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification” (Millipore). Para ello, 500 ng-1 µg de ADN total fue incubado con una solución de NaOH 3N a 37°C durante 10 minutos. A continuación, tras añadir 120 µl del reactivo de modificación, se incubó la muestra a 70°C durante 40 minutos. Seguidamente, se añadieron 200 µl de solución de desulfonación y se realizó la purificación en columna y recuperación del ADN en un volumen final de 40 µl en tampón de elución. Finalmente, el ADN modificado fue almacenado a -20°C.

1.2. Determinación de la metilación global del genoma

1.2.1. Análisis de secuencias genómicas repetitivas tipo LINE-1 (“Long Interspersed Nuclear Element-1”)

En el estudio en humanos la determinación de la metilación global del genoma se realizó mediante el análisis de secuencias genómicas repetitivas tipo retrotransposones llamados LINE-1. Dichas secuencias son ricas en dinucleótidos CpG susceptibles a metilación por lo que su nivel de metilación es considerado una buena estimación de la metilación global del genoma ([7813]). Para ello, se utilizó el kit “PyroMark® Q96 CpG LINE-1” (Qiagen) con el que se amplificó la secuencia de interés, para posteriormente determinar por pirosecuenciación la metilación de cuatro dinucleótidos CpG situados entre las posiciones 331 y 305 de dichos elementos LINE-1 (GenBank accession number X58075).

Todos los procesos de amplificación por PCR se realizaron en una cabina de flujo laminar vertical sin recirculación (Euro Aire, mod. FLV 60) y siguiendo normas estrictas para evitar la contaminación. Se amplificó un fragmento de secuencia LINE-1 de 146 Kb, mediante el uso de dos cebadores ó “primers” (“forward” y “reverse”) específicos para dicha secuencia, uno de ellos biotilado (“reverse”). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL utilizando 25 ng de ADN modificado, 0,4 mM dNTPs (Roche), 2 mM MgSO₄ (Life Technologies), 0,2 µM de cada cebador, 1X High Fidelity PCR Buffer (Life Technologies), y 1U de *Platinum® Taq High Fidelity* (Life Technologies). En todas las rondas de amplificación, se añadieron controles negativos de la PCR que contenían H₂O “RNasa-free” en vez de ADN modificado y el resto de componentes de la reacción en las cantidades descritas. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en el termociclador C1000™ (BioRad Laboratories) y, para ello, se procedió a una etapa de activación de la *Platinum® Taq* a 95°C durante 5 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturalización (94°C durante 30 segundos),

hibridación (50°C durante 30 segundos) y elongación (72°C durante 30 segundos), y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

La especificidad de la amplificación se comprobó por electroforesis en geles del 2% de agarosa. Se utilizó *DNA Molecular Weight Marker V* (8-587 bp) (Roche) como marcador de peso molecular. Los geles y las muestras se prepararon según Sambrook *et al.* ([2648]) y se utilizó TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) como tampón de electroforesis. Se prepararon minigeles de 7 x 10 cm y un grosor de 2-3mm y se aplicó un voltaje de 80 V durante 30 minutos. Un volumen equivalente a 3 µl del producto de la amplificación fue diluido en agua bidestilada estéril y se le añadió 1/6 parte del volumen de tampón de carga de ADN (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol). La visualización de las secuencias de ADN amplificadas se consiguió por tinción con bromuro de etidio y las imágenes fueron captadas por el sistema Gel Doc 2000 (BioRad Laboratories), tal y como ya ha sido descrito (apartado 1.1.1).

Una vez comprobada la amplificación, se procedió a la determinación del estado de metilación de las cuatro posiciones CpG del fragmento amplificado mediante pirosecuenciación, tecnología basada en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN mediante la detección de luminiscencia. Dicha determinación se realizó en el “Centre de Recerca en Agrigenòmica” (CRAG) de la Universidad Autònoma de Barcelona, utilizando el pirosecuenciador PSQ HS 96 (Biotage Inc.). Para ello, se realizó la purificación de los productos de la amplificación inmovilizando los fragmentos amplificados (marcados con biotina) sobre microesferas de sefarosa recubiertas con estreptavidina. Seguidamente, el ADN amplificado fue desnaturalizado obteniendo secuencias monocatenarias que se hibridaron con el cebador de secuenciación. A continuación, se procedió a la dispensación de nucleótidos según el orden establecido para la secuencia a analizar. En el estudio en humanos la secuencia a analizar fue TTYGTGGTGYGTYGTTTTTAAGTYGGTTT y el orden de dispensación de los nucleótidos fue ATCAGTGTGTCAGTCAGTTAGTCTG. La detección de la secuencia se basa en que con cada incorporación de nucleótidos por parte de la ADN polimerasa, se libera pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La ATP sulfurilasa es la responsable de convertir el PPi en ATP en presencia de adenosina 5' fosfosulfato, provocando la conversión de la luciferina en oxiluciferina mediada por el enzima luciferasa, generando luz visible en cantidades proporcionales a la cantidad de ATP. Así, la luz emitida se visualiza como picos en el pirograma obtenido. De este modo, cada señal luminosa es proporcional al número de nucleótidos incorporados.

A partir del pirograma resultante se calculó el porcentaje de la cantidad de citosina (C) relativa a la suma de cantidades de citosina y timina (T) de cada posición CpG. El promedio de las cantidades relativas de C en las cuatro posiciones analizadas se utilizó como nivel de metilación de LINE-1 y, por tanto, como nivel de metilación genómica.

En el estudio en el modelo experimental, la estandarización para analizar la metilación de secuencias repetitivas LINE-1 del genoma de rata no fue satisfactoria, dado que se detectaron amplificaciones inespecíficas en la etapa de la pirosecuenciación. Por ese motivo, la determinación de la metilación global se realizó mediante el ensayo “LUMA” (descrito en el apartado 1.2.2).

1.2.2. Análisis de la metilación global por LUMA (“Luminometric Methylation Assay”)

En el estudio en el modelo experimental, se determinó la metilación global del genoma mediante el ensayo “LUMA”, tal y como describió Karimi M. et al. ([8422]) con modificaciones ([8438]). Este ensayo consiste en la digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción sensibles ó insensibles a metilación, seguido de una fase final de extensión bioluminométrica capaz de cuantificar el grado de escisión por restricción mediante pirosecuenciación. Para ello, las muestras de ADN genómico son sometidas a digestión por la endonucleasa *HpaII* (sensible a metilación) y su isoesquízómero *MspI* (insensible a metilación) en reacciones en paralelo. Ambas enzimas reconocen la secuencia 5'-C[^]CGG-3'. Sin embargo, *HpaII* no digiere la diana de restricción cuando la citosina presente en el dinucleótido CpG está metilada, mientras que *MspI* digiere la diana independientemente del estado de metilación. Como factor de normalización de la cantidad de ADN sometido a digestión, se incluyó en ambas reacciones el enzima *EcoRI* cuya diana de restricción son secuencias 5'-G[^]AATTC-3'. De este modo, se sometieron a digestiones paralelas de *HpaII+EcoRI* y *MspI+EcoRI*, 500 ng de ADN genómico de tejido mamario ó tejido tumoral con 5 unidades del enzima correspondiente (New England Biolabs) y 1X de tampón de restricción que contiene un suplemento de S-adenosil-L-metionina (SAM) (New England Biolabs), en un volumen final de 20 µl. Las reacciones de digestión se realizaron por duplicado en placas de PCR de 96 pocillos (BioRad Laboratories) y se incluyeron controles negativos de ambas digestiones, que contenían H₂O “RNasa-free” en vez de ADN genómico y el resto de componentes en las cantidades descritas. Las reacciones de digestión se realizaron a 37°C en

un incubador (Memmert) durante 4 horas. Posteriormente, las muestras digeridas fueron analizadas en el “Centre de Recerca en Agrigenòmica” (CRAG) de la Universidad Autònoma de Barcelona, utilizando el pirosecuenciador PSQ HS 96. La digestión por las endonucleasas *HpaII* y *MspI* provocan extremos 5'-CG, mientras que la digestión por *EcoRI* produce extremos 5'-AATT. Estos extremos son elongados mediante la dispensación secuencial de nucleótidos y la acción de la ADN polimerasa. En este estudio, el orden de dispensación fue GTGTCACATGTGTG. Se obtuvieron pirogramas de cada una de las reacciones de digestión (*HpaII*+*EcoRI* y *MspI*+*EcoRI*), en los que el valor del pico de la posición 10 correspondió a la incorporación de G y, por tanto, fue proporcional a la digestión enzimática de *HpaII* ó *MspI*, y el valor del pico de la posición 9 correspondió a la incorporación de T en la secuencia de síntesis, siendo proporcional a la digestión mediada por *EcoRI* (Figura 16).

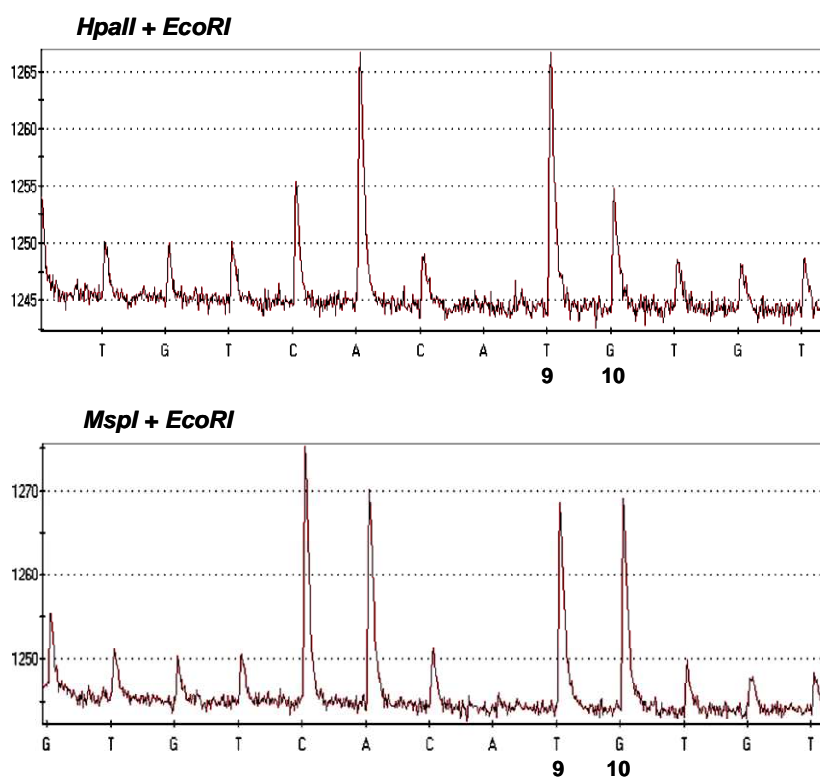


Figura 16. Pirograma representativo del ensayo “LUMA”. Pirogramas obtenidos para cada una de las reacciones de digestión (*HpaII*+*EcoRI* y *MspI*+*EcoRI*) realizadas para una determinada muestra. En la base de cada pirograma se indican las posiciones 9 (incorporación de T) y 10 (incorporación de G).

De esta forma, se pudo determinar el porcentaje de metilación global para cada muestra aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Metilación global (\%)} = 1 - [(HpaII(G)/EcoRI(T))/(MspI(G)/EcoRI(T))] \times 100$$

1.3. Determinación de la metilación gen-específica

1.3.1. Análisis cualitativo del estado de metilación del ADN por MSP (“Methylation Specific PCR”)

La determinación cualitativa de la metilación génica se realizó mediante PCR específica de metilación basada en la amplificación con cebadores específicos de ADN metilado y de ADN no metilado. Para ello, a partir de la secuencia de ADN modificado con bisulfito sódico, se diseñaron cebadores de la región promotora del gen de interés con los que amplificar específicamente el alelo no metilado ó el alelo metilado en dinucleótidos CpG.

En el estudio en humanos se ha determinado el estado de metilación de un panel de 12 genes, todos ellos implicados en las capacidades adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo neoplásico ([7349]): autosuficiencia en señales de proliferación (ESR1, PRB, RASSF1A), insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento (NES1), evasión de la apoptosis (TWIST1), inducción de la angiogénesis (MASPINA), activación de la invasión y metástasis (CXCL12, CDH1), evasión del sistema inmune (HLA-A) y capacidad proliferativa ilimitada (BRCA1, p16, RAR β 2), tal y como se puede observar en la Figura 17.

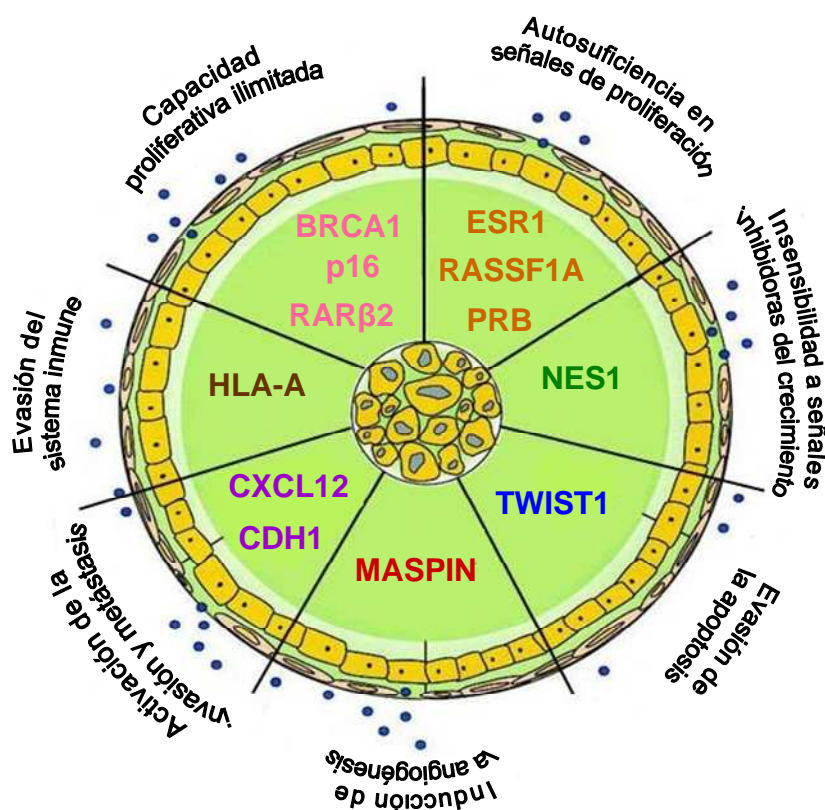


Figura 17. Genes de interés relacionados con las capacidades adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo neoplásico.

Este análisis cualitativo del estado de la metilación de los genes de interés se realizó en muestras de sangre periférica de voluntarias sanas y enfermas, y de tejido mamario y tumoral de enfermas de cáncer de mama. A partir del ADN modificado se realizaron las amplificaciones específicas de alelo utilizando los cebadores (Tabla 5) y las condiciones de amplificación (Tabla 6) previamente estandarizadas en el laboratorio. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador C1000 (BioRad Laboratories) y en un volumen final de 25 μ L utilizando: 25 ng de ADN modificado, 0,4 mM dNTPs (Roche), 2,5 μ l Buffer 10x (Roche), 0,8 pmoles/ μ l de cada cebador (“forward” y “reverse”), 1,25 U ADN polimerasa (Roche) y las cantidades de $MgCl_2$ (Roche) indicadas en la Tabla 6.

En todas las amplificaciones se incluyeron controles positivos de metilación y de no metilación y controles negativos. Como control positivo de metilación se utilizó ADN humano modificado 100% metilado (Qiagen). Dicho control se generó por metilación de todos los dinucleótidos CpG con la enzima metilasa *SssI* y la posterior modificación por bisulfito. Como control positivo de no metilación se utilizó ADN humano modificado 0% metilado (Qiagen). Por último, el control negativo contenía H_2O “RNasa-free” en vez de ADN modificado. 10 μ l de los productos amplificados fueron comprobados por electroforesis en geles del 2% de agarosa aplicando un voltaje de 80 V durante 30 minutos. La visualización de las secuencias de ADN amplificadas se consiguió por tinción con bromuro de etidio y por transiluminación con luz ultravioleta utilizando el sistema Gel Doc 2000 (BioRad Laboratories). Como criterio de validación de la correcta modificación del ADN se consideró necesaria la detección de los alelos no metilados tanto para el gen p16 como para RASSF1A. Una vez comprobada la detección de dichos alelos en cada muestra, se realizaron las amplificaciones del resto de genes del estudio.

En el estudio en muestras experimentales, se determinó el estado de metilación de la región promotora del gen RASSF1A en muestras de tejido mamario y de tejido tumoral. El procedimiento fue el mismo que el empleado en el estudio en humanos. La validación de la correcta modificación por bisulfito sódico se realizó mediante la amplificación y posterior detección de banda de alelo no metilado de RASSF1A. Los cebadores y las condiciones utilizadas en la amplificación se detallan en las Tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5. Cebadores utilizados en el análisis por “MSP” en el estudio en humanos y en el modelo experimental. En la columna “ALELO”, “M” hace referencia a los cebadores utilizados para la detección del alelo metilado, y “U” los cebadores utilizados para la detección del alelo no metilado. En la columna “SECUENCIA DEL CEBADOR”, “F” hace referencia a los cebadores “forward” y “R” a los cebadores “reverse”, “REF.”: referencia bibliográfica de los cebadores utilizados.

	GEN	ALELO	SECUENCIA DEL CEBADOR (5'-3')	PRODUCTO (pb)	REF.
HUMANOS	p16	M	F-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC R-GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150	[6209]
		U	F-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT R-CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	
	RASSF1A	M	F-GTTGGTATTCGTTGGGCGC R-GCACCACGTATACGTAACG	160	[6235]
		U	F-GGTTGTATTTGGTTGGAGTG R-CTACAAACCTTTACACACAACA	180	
	BRCA1	M	F-GAGAGGTTGTTGTTTAGCGG R-CGCGCAATCGCAATTTAAT	146	[6789]
		U	F-TGGTAATGGAAAAGTGTGGGAA R-CCCATCCAAAAAATCTCAACAAA		
	RARβ2	M	F-TCGAGAACCGGAGCGATTTCG R-GACCAATCCAACCGAAACGA	145	[6952]
		U	F-AACCAATCCAACCAAAACAA R-TTGAGAATGTGAGTGATTGA	146	
	ESR1	M	F-GATACGGTTTGTATTTGTTCGC R-CGAACGATTCAAAAACCTCCAAC	123	[6202]
		U	F-GGATATGGTTTGTATTTGTGTTGT R-CAAACAATTCAAAAACCTCCAAC		
	PRB	M	F-TGATTGTCGTTTCGTAGTACG R-CGACAATTTAATAACACGCG	220	[6202]
		U	F-TGATTGTTGTTTGTAGTATG R-CAACAATTTAATAACACACA		
	NES1	M	F-TTCGAAGTTTATGGCGTTTC R-TTATTTCCGCAATACGCGAC	137	[6791]
		U	F-TTGTAGAGGTGGTGTGTTT R-CACACAATAAAAACAAAAACCA	128	
	CDH1	M	F-GTAGGTGAATTTTATGTTAATTAGCGGTAC R-CCCATAACTAACCGAAAACGCCG	209	[6790]
		U	F-GTAGGTGAATTTTATGTTAATTAGTGGTA R-ACCCATAACTAACC AAAACACCA	211	
TWIST1	M	F-TTTCGGATGGGGTGTATATCG R-GACGAACGCGAAACGATTTC	120	[7474]	
MASPINA	M	F-ATTTTATCGAATATTTTATTTTTCGG R-TAACTCACCTAAACAACACCGCC	250	[7005]	
HLA-A	M	F-TAGGTTTTCGAAGGCGGTGTA R-CCATAACGACCATCCTCGAC	256	[7452]	
CXCL12	M	F-GTTGTAGTGTGGGGTTT R-AAACAAACAAAACACTACA	189	[7453]	
MODELO EXPERIMENTAL	RASSF1A	M	F-TTTGATCGGGTTATGTCGGC R-GATAACCACGACCCGAAACG	169	[6185]
		U	F-TTTGATTGGGTTATGTTGGT R-AATAACCACAACCCAAAACA		

Tabla 6. Condiciones de amplificación utilizadas en el análisis por “MSP” en el estudio en humanos y en el modelo experimental. Entre paréntesis se indica la concentración de MgCl₂ empleada en la amplificación de cada gen.

p16 METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)				p16 NO METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	35X	95°C	30 seg.
Hibridación		64°C	30 seg.	Hibridación		59°C	30 seg.
Elongación		72°C	30 seg.	Elongación		72°C	30 seg.
Extensión final	1X	72°C	4 min.	Extensión final	1X	72°C	4 min.

RASSF1A METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)				RASSF1A NO METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.
Hibridación		56°C	55 seg.	Hibridación		54°C	55 seg.
Elongación		72°C	30 seg.	Elongación		72°C	30 seg.
Extensión final	1X	72°C	7 min.	Extensión final	1X	72°C	7 min.

BRCA1 METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)				BRCA1 NO METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	38X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	37X	94°C	30 seg.
Hibridación		61°C	55 seg.	Hibridación		55°C	30 seg.
Elongación		72°C	30 seg.	Elongación		72°C	30 seg.
Extensión final	1X	72°C	10 min.	Extensión final	1X	72°C	10 min.

RARβ2 METILADO HUMANO (2,5 mM MgCl ₂)				RARβ2 NO METILADO HUMANO (2,5 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	37X	95°C	45 seg.	Desnaturalización	37X	95°C	45 seg.
Hibridación		55°C	45 seg.	Hibridación		52°C	45 seg.
Elongación		72°C	45 seg.	Elongación		72°C	45 seg.
Extensión final	1X	72°C	5 min.	Extensión final	1X	72°C	5 min.

Tabla 6. Condiciones de amplificación utilizadas en el análisis por “MSP” en el estudio en humanos y en el modelo experimental. Entre paréntesis se indica la concentración de MgCl₂ empleada en la amplificación de cada gen (continuación).

ESR1 METILADO HUMANO (2,3 mM MgCl ₂)				ESR1 NO METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.
Hibridación		54°C	45 seg.	Hibridación		50°C	45 seg.
Elongación		72°C	45 seg.	Elongación		72°C	60 seg.
Extensión final	1X	72°C	8 min.	Extensión final	1X	72°C	8 min.

PRB METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)				PRB NO METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.
Hibridación		55°C	45 seg.	Hibridación		55°C	45 seg.
Elongación		72°C	45 seg.	Elongación		72°C	45 seg.
Extensión final	1X	72°C	10 min.	Extensión final	1X	72°C	10 min.

NES1 METILADO HUMANO (2,5 mM MgCl ₂)				NES1 NO METILADO HUMANO (2,5 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	40X	95°C	60 seg.	Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.
Hibridación		54°C	60 seg.	Hibridación		55°C	30 seg.
Elongación		72°C	60 seg.	Elongación		72°C	45 seg.
Extensión final	1X	72°C	10 min.	Extensión final	1X	72°C	4 min.

CDH1 METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)				CDH1 NO METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	37X	95°C	30 seg.
Hibridación		59°C	45 seg.	Hibridación		59°C	45 seg.
Elongación		72°C	45 seg.	Elongación		72°C	45 seg.
Extensión final	1X	72°C	10 min.	Extensión final	1X	72°C	10 min.

Tabla 6. Condiciones de amplificación utilizadas en el análisis por “MSP” en el estudio en humanos y en el modelo experimental. Entre paréntesis se indica la concentración de MgCl₂ empleada en la amplificación de cada gen (continuación).

TWIST1 METILADO HUMANO (3 mM MgCl ₂)				MASPINA METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	40X	94°C	30 seg.	Desnaturalización	37X	94°C	60 seg.
Hibridación		55°C	30 seg.	Hibridación		52°C	60 seg.
Elongación		72°C	30 seg.	Elongación		72°C	60 seg.
Extensión final	1X	72°C	5 min.	Extensión final	1X	72°C	7 min.

HLA-A METILADO HUMANO (2 mM MgCl ₂)				CXCL12 METILADO HUMANO (2,5 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	40X	95°C	30 seg.	Desnaturalización	40X	94°C	45 seg.
Hibridación		59°C	30 seg.	Hibridación		57°C	45 seg.
Elongación		72°C	30 seg.	Elongación		72°C	45 seg.
Extensión final	1X	72°C	5 min.	Extensión final	1X	72°C	5 min.

RASSF1A METILADO RATA (2 mM MgCl ₂)				RASSF1A NO METILADO RATA (2 mM MgCl ₂)			
ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO	ETAPA	CICLOS	T ^a	TIEMPO
Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.	Activación <i>Taq pol.</i>	1X	95°C	5 min.
Desnaturalización	38X	95°C	45 seg.	Desnaturalización	38X	95°C	45 seg.
Hibridación		60°C	45 seg.	Hibridación		57°C	45 seg.
Elongación		72°C	45 seg.	Elongación		72°C	45 seg.
Extensión final	1X	72°C	10 min.	Extensión final	1X	72°C	10 min.

1.3.2. Análisis semi-cuantitativo del estado de metilación del ADN por COBRA (“COmbined Bisulfite Restriction Assay”)

El análisis del estado de metilación gen-específico del ADN se amplió utilizando la técnica semi-cuantitativa “COBRA”, basada en la combinación de la amplificación por PCR y la digestión de su producto con enzimas de restricción ([6255]). La determinación se realizó a partir de ADN modificado con bisulfito. No obstante, a diferencia de la técnica “MSP”, los cebadores utilizados en la reacción de PCR no contienen dinucleótidos CpG y, por tanto, la amplificación es independiente del estado de metilación de las secuencias. Los productos amplificados son posteriormente digeridos mediante enzimas de restricción cuyas dianas contienen dinucleótidos CpG. De esta manera, si las citosinas de la diana están metiladas permanecen como citosinas tras la modificación por bisulfito y, por tanto, se produce la digestión del fragmento. Sin embargo, si las citosinas de la diana no están metiladas, tras la acción del bisulfito se amplifican como timinas y la diana de restricción se pierde. El porcentaje de metilación se obtiene calculando la ratio entre el ADN digerido y el total de ADN sometido a digestión.

En el estudio en humanos, se determinó mediante “COBRA” la metilación del gen RASSF1A y ESR1 en muestras de ADN modificado por bisulfito de sangre periférica de voluntarias sanas y enfermas, y de tejido mamario y tumoral de enfermas de cáncer de mama.

Gen RASSF1A humano

La determinación del estado de metilación de RASSF1A se realizó como describió Peters I. y colaboradores ([7517]), con modificaciones en cuanto a las condiciones de la amplificación por PCR. Dicha amplificación consistió en dos rondas de PCR, que permitieron amplificar una secuencia de 205 pb situada en la región promotora del gen RASSF1A humano y próxima a la secuencia analizada por “MSP”. Las secuencias del gen RASSF1A amplificadas en las rondas de PCR así como los cebadores empleados se muestran en la Figura 18.

5' - **GTTTTTGTAGTTTAATGAGTTTAGGTTTTTT** ^T **TGATATGGTTTGGTTGGGTTTGTGTTTTGTT**
GGTTTTGGGTGTAGTAAGTGTGGGTGGGTGGGTTATAGGGTGGGTTT ^{TG} **ATTTTAGTGTTTT**
TTTTAGGATTTAGATTGGGTGGTGGGAAGGAGTTGAGGAGAGTTGTGTAATGGAAATTTGGGTGTA
GGGATTGTGGGGTTGAAGGTGGGGTTGGGTGTGTTTTTGTAGAGTTTTTTTTGTTTTGTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTATATTTTATTTTGGATGTTATAATGATGGTGATTGTAAGTAT
TATGTGGAGATATTTGTGTTTTTTGGAGGTTAGTTTTTATTGTGTTAGAGGAAGAGGGT - 3'

Cebador “Forward”: 5' - **GTTTTGGTAGTTTAATGAGTTTAGGTTTTTT** - 3'

Cebador “Reverse 1”: 5' - **ACCTCTTCCTCTAACACAATAAACTAAC** - 3'

Cebador “Reverse 2”: 5' - **CCCCACAATCCCTACACCCAAAT** - 3'

T^TTGA: Lugar de restricción en el alelo metilado (Diana enzimática: T^TCGA).

Figura 18. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen RASSF1A amplificada por PCR en la técnica “COBRA” en el estudio en humanos.

La primera ronda de amplificación se realizó a partir de 25 ng de ADN modificado con 2,5 µl Buffer 10x (Roche), 2,5 mM MgCl₂ (Roche), 0,4 mM dNTPs (Roche), 0,8 pmoles/µl de cada cebador (“Forward” y “Reverse 1”) y 1,25 U ADN polimerasa (Roche), llevado a un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador C1000 (BioRad Laboratories) y las condiciones establecidas fueron: activación de la *Taq polimerasa* (95°C durante 5 minutos), 38 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (54°C durante 45 segundos) y elongación (72°C durante 45 segundos) y una etapa final de extensión (72°C durante 5 minutos). Para realizar la segunda ronda de amplificación, se partió de 1 µl de producto amplificado, 0,8 pmoles/µl de cada cebador (“Forward” y “Reverse 2”) y el resto de reactivos en las cantidades anteriormente indicadas, llevado a un volumen final de 25 µl. Las condiciones de la segunda ronda fueron: activación de la *Taq polimerasa* (95°C durante 5 minutos), 38 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (55°C durante 45 segundos) y elongación (72°C durante 45 segundos) y una etapa final de extensión (72°C durante 5 minutos).

En todas las amplificaciones se incluyeron controles con diferente porcentaje de metilación (100%, 50%, 25%, 10% y 0%) y preparados a partir de ADN control 100% metilado y ADN control no metilado (0% metilado) (Qiagen). También se incluyó un control negativo sin ADN modificado. La especificidad de la segunda ronda de amplificación se comprobó por electroforesis en geles del 2% de agarosa utilizando 2 µl del producto amplificado de cada una de las muestras, tal y como se ha descrito anteriormente.

Una vez comprobada la amplificación, los productos de PCR obtenidos en la segunda ronda fueron sometidos a digestión enzimática empleando la enzima *TaqAI* (New England Biolabs®) cuya diana de restricción es 5'-T[^]CGA-3' y que se encuentra por duplicado en la secuencia amplificada (Figura 18). La reacción de digestión se realizó con 10 µl del producto amplificado, 3 µl NEBuffer 10x (New England Biolabs®), 10 U *TaqAI* (New England Biolabs®) y H₂O “RNasa-free” hasta un volumen final de 30 µl, en el termociclador Techno (Progene) a 65°C durante 4 horas. Finalmente, 15 µl del producto digerido y 1,6 µl de tampón de carga de ADN (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol) se sometieron a una electroforesis en gel del 12% de poliacrilamida a 80 V durante 2 horas y 15 minutos, utilizando como tampón de electroforesis TBE 1X (89 mM TRIS-borato, 2 mM EDTA pH8,0). Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0,1% durante 15 minutos y la visualización de las bandas obtenidas se realizó mediante el sistema Gel Doc 2000 (BioRad Laboratories) tras iluminar el gel con luz ultravioleta. Se utilizó el programa Quantity One™ (BioRad Laboratories) para la cuantificación densitométrica de dichas bandas. La digestión del fragmento de 205 pb resultó en un patrón de bandas de 174 pb, 112 pb, 93 pb, 81 pb y 31 pb. El grado de metilación del gen RASSF1A se obtuvo a partir del valor densitométrico de las bandas digeridas (174 pb + 112 pb + 93 pb + 81 pb + 31 pb) en relación al total (205 pb + 174 pb + 112 pb + 93 pb + 81 pb + 31 pb). Los controles de distinto grado de metilación (100%, 50%, 25%, 10% y 0%) sirvieron de método de validación de la correcta digestión enzimática, dado que el porcentaje de metilación teórico coincidió con el porcentaje obtenido por densitometría.

Gen ESR1 humano

Respecto a la determinación del estado de metilación de ESR1, ésta se realizó según Tominaga K. y colaboradores ([7450]). De este modo, se determinó el grado de metilación de una secuencia de 206 pb situada en la región promotora del gen ESR1 y que incluía la secuencia analizada por “MSP”, como se muestra en la Figura 19.

5' -GGTTTTTGAGTTTTTTGTTTTGTGGGGATATGGTTTGTATTTTGTGG^TGGTTATGGATTA
 TGATTATGATTTTTTATATTAAAGTATTTGGGATGGTTTTATTGTATTAGATTTAAGGGAAATGAG
 TTGGAGTTTTTGAATTGTTTGTAGTTTAAGATTTTTTTGGAGTGGTTTTTTGGGTGAGGTGTATTT
 GGATAGTAGTAAGTT - 3'

Cebador "Forward" COBRA: 5' -GGTTTTTGAGTTTTTTGTTTTG - 3'

Cebador "Reverse" COBRA: 5' -AACTTACTACTATCCAAATACACCTC - 3'

TG^TG: Lugar de restricción en el alelo metilado (Diana enzimática: CG^CG).

Cebador "Forward" MSP: 5' -GATACGGTTTGTATTTTGTTCGC - 3'

Cebador "Reverse" MSP: 5' -CGAAGACTTCAAAAACCTCCAAC - 3'

Figura 19. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen ESR1 amplificada por PCR en la técnica "COBRA" en el estudio en humanos.

La amplificación se realizó a partir de 25 ng de ADN modificado con 2,5 µl Buffer 10x (Roche), 2,5 mM MgCl₂ (Roche), 0,4 mM dNTPs (Roche), 0,8 pmoles/µl de cada cebador ("forward" y "reverse") y 1,25 U ADN polimerasa (Roche), llevado a un volumen final de 25 µl. Para ello, se utilizó el termociclador C1000 (BioRad Laboratories), y las condiciones de amplificación fueron: activación de la *Taq polimerasa* (95°C durante 10 minutos), 40 ciclos de desnaturalización (94°C durante 30 segundos), hibridación (55°C durante 60 segundos) y elongación (72°C durante 60 segundos) y una etapa final de extensión (72°C durante 10 minutos). Asimismo, se incluyeron controles de distinto grado de metilación (100%, 50%, 25%, 10% y 0%) y controles negativos.

Una vez finalizada la PCR, se comprobó la especificidad de la amplificación por electroforesis en geles del 2% de agarosa utilizando 2 µl del producto de cada una de las muestras, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Seguidamente, se realizó una purificación de las secuencias amplificadas mediante el kit "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (GE Healthcare Life Sciences) utilizando columnas GFX. Los productos amplificados y purificados fueron sometidos a digestión enzimática empleando la enzima *BstUI* (New England Biolabs®) cuya diana de restricción es 5'-CG^CG-3', que está presente en la secuencia de 206 pb amplificada y que da como resultado dos fragmentos de 158 pb y 48 pb (Figura 19). La reacción de digestión incluyó 10 µl del producto amplificado, 3 µl NEBuffer 10x (New England Biolabs®), 20 U *BstUI* (New England Biolabs®) y H₂O "RNase-free" hasta un volumen final de 30 µl. Dicha digestión se realizó en el termociclador Techno (Progene) a 60°C durante 4 horas. Los productos digeridos se sometieron a una electroforesis en gel del 12% de poliacrilamida a 80V durante 2 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de

etidio al 0,1% y la visualización de las bandas obtenidas permitió realizar el posterior análisis densitométrico. En este caso, el grado de metilación del gen ESR1 se obtuvo a partir del valor densitométrico de las bandas digeridas (158 pb + 48 pb) en relación al total (206 pb + 158 pb + 48 pb).

1.3.3. Análisis cuantitativo del estado de metilación del ADN por pirosecuenciación

La determinación cuantitativa del estado de metilación gen-específica se realizó mediante la amplificación por PCR de secuencias ricas en dinucleótidos CpG, presentes en regiones promotoras de los genes en estudio, y su posterior determinación del estado de metilación por pirosecuenciación.

En el estudio en humanos se determinó de forma cuantitativa la metilación de regiones promotoras de los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A. Para ello, se analizaron muestras humanas de sangre periférica tanto de voluntarias sanas como de pacientes, y de tejido mamario y tumoral de pacientes con cáncer de mama. Por lo que respecta al estudio en el modelo experimental, se determinó el estado de metilación de los genes RASSF1A y TIMP3 en muestras de tejido mamario y tumoral.

Gen BRCA1 humano

En el caso del gen BRCA1 se amplificó una secuencia de 205 pb utilizando cebadores previamente descritos (Figura 20) ([8457], [8458]). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ L con 25 ng de ADN modificado, 0,4 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 1 pmol/ μ l de cada cebador (“forward” y “reverse”), 1X High Fidelity PCR Buffer, y 1U de *Platinum[®] Taq High Fidelity* (Life Technologies). En todas las rondas de amplificación, se añadieron controles negativos que contenían H₂O “RNasa-free” en vez de ADN modificado. Dichas amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador C1000™ (BioRad Laboratories) y las condiciones establecidas fueron: activación de la *Taq polimerasa* (95°C durante 5 minutos), 45 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (55°C durante 45 segundos) y elongación (72°C durante 45 segundos) y una etapa final de extensión (72°C durante 5 minutos). La especificidad de la amplificación se comprobó por electroforesis de 2 μ l de muestra en geles del 2% de agarosa mediante tinción con bromuro de etidio, y la visualización por transiluminación con luz ultravioleta utilizando el sistema Gel Doc 2000 (BioRad Laboratories). Una vez comprobada la amplificación, se procedió a la determinación

del estado de metilación de 6 posiciones CpG del fragmento amplificado mediante pirosecuenciación, proceso realizado en el “Centre de Recerca en Agrigenòmica” (CRAG) de la Universidad Autònoma de Barcelona, utilizando el pirosecuenciador PSQ HS 96 (Biotage Inc.). A partir del pirograma resultante se calculó el porcentaje de la cantidad de citosina (C) relativa a la suma de cantidades de citosina y timina (T) de cada posición CpG. El promedio de las cantidades relativas de C en las 6 posiciones se utilizó como nivel de metilación de BRCA1 para cada muestra analizada.

5' - **ATTTAGAGTAGAGGGTGAAGG**TTTTTTGAGTGTAGGGTTTAGTTATTTGAGAAATTTTATAGTTTG
TTTTTTT**G**TTTAGGAAGTTTTAGT**G**AGTTTA**T**GTT**G**T**G**TAGTT**G**TAGTTTTAATTTATTTGTAATTTTTGT
GTTTTTTTGTGTTATGGAAATTAAGGGTTATTGTTAAGTAGTAGTTTTTTAGAATATGAAATTAAGGT
ATAATTAGAGGATGGGAGGGATAGA- 3'

Cebador “Forward”: 5' - **ATTTAGAGTAGAGGGTGAAGG** - 3'

Cebador “Reverse”: 5' - [bio]- **TCTATCCCTCCCATCCTCTAATT** - 3'

Cebador de secuenciación: 5' - **TTGAGAAATTTTATAGTTTGTTTT** - 3'

Posiciones CpG analizadas: **T**

Figura 20. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen BRCA1 amplificada por PCR y analizada por pirosecuenciación en el estudio en humanos.

Gen ESR1 humano

Por lo que respecta a la determinación de la metilación del gen ESR1, también se emplearon cebadores utilizados en trabajos publicados por otros autores ([8459]), que permitieron amplificar una secuencia de 125 pb presente en la región promotora de dicho gen, de la que se analizaron 3 posiciones CpG susceptibles a metilación (Figura 21). Tanto las condiciones de amplificación por PCR como el procedimiento seguido, fueron idénticos al descrito anteriormente para el gen BRCA1 humano.

5' - **TGTGTTTTTTTTTTAGGTGG**TTTGTGGTTTTTGAGTTTTTTGTTTTGTGG**GGATATGGTTT**
GTATTTTGTTT**G**T**G**TTA**T**GGATTATGATTATGATTTTTTA**TATTA**AGTATTTGGGATGGTT- 3'

Cebador “Forward”: 5' - **TGTGTTTTTTTTTTAGGTGG** - 3'

Cebador “Reverse”: 5' - [bio]- **AACCATCCCAAATACTTTAATA** - 3'

Cebador de secuenciación: 5' - **GGATACGGTTTGTATTTTG** - 3'

Posiciones CpG analizadas: **T**

Figura 21. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen ESR1 amplificada por PCR y analizada por pirosecuenciación en el estudio en humanos.

Gen RASSF1A humano

Debido a las dificultades técnicas para estandarizar la pirosecuenciación del gen RASSF1A mediante el uso de cebadores publicados en fuentes bibliográficas, se decidió emplear cebadores comerciales. De este modo, se utilizó el kit “Hs_RASSF1_01_PM PyroMark CpG Assay” (Qiagen) que permitió determinar la metilación de 6 posiciones CpG de una secuencia amplificada de 183 pb, presente en la región promotora del gen RASSF1A (Figura 22). Las secuencias se amplificaron en un volumen final de 25 µL utilizando 25 ng de ADN modificado con 0,4 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 1X PCR Primer Set y 1U de *Platinum*[®] *Taq High Fidelity* (Life Technologies). Las condiciones establecidas fueron: activación de la *Taq polimerasa* (95°C durante 5 minutos), 45 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (55°C durante 45 segundos) y elongación (72°C durante 45 segundos) y una etapa final de extensión (72°C durante 5 minutos). Tanto la comprobación de la amplificación como la pirosecuenciación fueron realizadas tal y como se ha descrito para el gen BRCA1 humano.

5' -GGTAGTGTAGTTGTTGCGGGTTAAGTTGTGGT-3'

Posiciones CpG analizadas: T

Figura 22. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen RASSF1A analizada por pirosecuenciación en el estudio en humanos.

Gen RASSF1A de rata

Por lo que respecta a este gen, no se encontraron comercializados cebadores para genoma de rata, por lo tanto, se empleó el kit para genoma de ratón “Mm_Rassf1_02_PM PyroMark CpG Assay” (Qiagen), dado que la región amplificada con estos cebadores estaba altamente conservada en el genoma de rata. De esta forma, se amplificó por PCR una secuencia de 73 pb y se analizaron por pirosecuenciación 3 posiciones CpG susceptibles a metilación (Figura 23). La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 µL utilizando 25 ng de ADN modificado con 0,4 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 1X PCR Primer Set y 1U de *Platinum*[®] *Taq High Fidelity* (Life Technologies). Las condiciones establecidas para la amplificación fueron: activación de la *Taq polimerasa* (95°C durante 5 minutos), 45 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (55°C durante 45 segundos) y elongación (72°C durante 45 segundos) y una etapa final de extensión (72°C durante 5 minutos). La

comprobación de la amplificación así como la pirosecuenciación fueron realizadas tal y como se ha descrito para el gen BRCA1 humano.

5' - TGTATA GTGGTGA - 3'

Posiciones CpG analizadas: T

Figura 23. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen RASSF1A analizada por pirosecuenciación en el estudio en el modelo experimental.

Gen TIMP3 de rata

Por último, para el análisis de la metilación del gen TIMP3 en muestras de rata, se empleó el kit “Rn_Timp3_06_PM PyroMark CpG Assay” (Qiagen), con el que se amplificó una secuencia de 165 pb de la región promotora. Su posterior pirosecuenciación permitió analizar 6 posiciones CpG susceptibles a metilación (Figura 24). Las condiciones empleadas en la amplificación por PCR, la comprobación y la pirosecuenciación fueron idénticas a las anteriormente detalladas para el estudio del gen RASSF1A de rata.

5' - TTGGGGGATGTGATTAAGTGGTTAAGGGTGGTTGGTGTATGAGTTGTGGA - 3'

Posiciones CpG analizadas: T

Figura 24. Secuencia modificada por bisulfito (considerando el alelo no metilado) de la región promotora del gen TIMP3 analizada por pirosecuenciación en el estudio en el modelo experimental.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

2.1. Extracción y purificación de ARN total

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

para la manipulación del ARN fueron marcados y guardados por separado. A su vez, el material metálico y de vidrio se trató con calor, incubándolo a +200°C entre 12-14 horas. Por último, las superficies de trabajo y las pipetas automáticas utilizadas fueron tratadas con solución inhibidora de RNasas (“RNasa Away”-Molecular BioProducts-).

En el estudio en el modelo experimental, la extracción de ARN total a partir de tejido tumoral, se realizó siguiendo el procedimiento del kit “RNeasy Tissue” (Qiagen), basado en la unión del ARN a una membrana de partículas de sílica en presencia de una elevada concentración de sales. Se pesaron 30 mg de tejido pulverizado en un tampón desnaturante que contenía β -mercaptoetanol y tiocianato de guanidina para inactivar las RNasas, asegurando así una buena purificación de ARN intacto. Se utilizó un “Polytron” (Kinematica®) para la homogenización del tejido. Tras una centrifugación de 3 minutos a 11.000 g, el ARN quedó en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas quedaron retenidas en la interfase y en la fase orgánica. El ARN se unió a una membrana de sílica y se lavó con diferentes soluciones provistas por el kit. Finalmente, se recuperó por elución con agua libre de RNasas y fue almacenado a -80°C.

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

La integridad del ARN extraído se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 2% y la cuantificación y pureza de dicho ARN se determinó a partir de 2 μ l de muestra utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), tal y como ya ha sido descrito (apartado 1.1.1 de esta sección).

2.2. Análisis de la expresión de ARNm. Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (“Real-Time PCR”)

La PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa, es un método donde tiene lugar la amplificación y cuantificación del ADN de forma simultánea. Dicha técnica fue empleada para cuantificar el ARN mensajero a partir de las muestras de ADN complementario (ADNc), el cual se sintetizó a partir de 2 μ g de ARN total utilizando el sistema “High Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystem). Las muestras fueron incubadas con 10 μ l de *RT mix* durante 10 minutos a +25°C, 120 minutos a +37°C y, finalmente, 5 segundos a +85°C. El ADNc resultante fue diluido a una concentración de 25 ng/ μ l y, posteriormente, almacenado a -20°C.

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

Se realizó el análisis de expresión mediante la metodología TaqMan[®] (Applied Biosystem). Se amplificaron 25 ng de ADNc utilizando la mezcla de reactivos “TaqMan Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystem) y el ensayo TaqMan[®] apropiado (Tabla 7) en un volumen final de 25 μ l. Cada ensayo contiene los cebadores y una sonda marcada fluorescentemente, específica para el gen de estudio. Todas las muestras fueron amplificadas por duplicado en un equipo MyiQ5-iCycler (BioRad Laboratories) con el siguiente programa: 1 ciclo de +95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de +95°C durante 15 segundos y +60°C durante 60 segundos. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (sin ADNc).

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

Tabla 7. Ensayos TaqMan® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante “Real-Time PCR”.

Símbolo del gen	Nombre	Ref. TaqMan®
Cdkn2c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	Rn00590868_m1
Rassf1a	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	Rn01445298_m1
Timp3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	Rn00441826_m1
Dnmt1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	Rn00709664_m1
Dnmt3a	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	Rn01469994_g1
Dnmt3b	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	Rn01536419_m1
Hprt1	Hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransferase 1	Rn01527840_m1

3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS

3.1. Determinación de la actividad enzimática ADN metiltransferasa

3.1.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos nucleares

En el estudio en muestras experimentales, la obtención de extractos proteicos nucleares de tejido glandular mamario y tumoral se realizó mediante el kit “EpiQuik™ Nuclear Extraction” (Epigentek). A partir de 25 mg de tejido pulverizado, se realizó una pre-lisis de la muestra añadiendo 5 ml/g de tampón pre-extracción NE1 (1x) con 5 µl/g de DTT. Seguidamente, se disgregó el tejido con la ayuda de un émbolo de homogeneización manual y manteniendo en todo momento la muestra en contacto con hielo. Una vez homogeneizado, el tejido fue incubado en hielo durante 15 minutos y centrifugado a 12000 rpm a +4°C durante 10 minutos. El “pellet” celular fue resuspendido en 2 volúmenes de tampón de extracción que contenía DTT y PIC (“Protease Inhibitor Cocktail” 1000x) en una relación 1/1000. A continuación, la suspensión celular obtenida se incubó en contacto con hielo durante 15 minutos. Con el fin de incrementar el rendimiento de la extracción, se sonicó la muestra durante 10 segundos a potencia media un total de 3 veces, utilizando el sonicador “Ultrasonic Homogenizer 3000” (Biologics Inc.) y manteniendo la muestra en todo momento en hielo. Por último, se realizó una centrifugación a 13200 rpm durante 10 minutos a +4°C, conservando a -80°C el sobrenadante obtenido.

La cuantificación proteica de los extractos nucleares obtenidos se realizó mediante el método de “Lowry”, utilizando el kit comercial “DC™ Protein Assay II” (BioRad

Laboratories). El procedimiento requirió la dilución apropiada de las muestras en tampón de extracción que contenía DTT y PIC en una relación 1/1000. A su vez, fue necesaria la preparación de un banco de diluciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA) diluida en el mismo tampón de extracción, dado que éste presentaba absorbancia a 750 nm. Debido a la presencia de detergente en el tampón de extracción, se preparó reactivo A' formado por los reactivos A y S del kit, añadiéndose 20 µl de reactivo S por cada mililitro de reactivo A. Se realizaron duplicados de los extractos diluidos, de las distintas diluciones de BSA (2 mg/ml, 1.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml y 0.125 mg/ml), así como del blanco formado por tampón de extracción con DTT y PIC. A 5 µl de cada muestra se le añadieron 25 µl de reactivo A' y 200 µl de reactivo B. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se procedió a la lectura de la absorbancia a 750 nm. A partir de las absorbancias del banco de diluciones de BSA se obtuvo la recta patrón, empleada para calcular la concentración proteica de cada una de las muestras. Las diluciones cuantificadas de los extractos nucleares se alicuotaron y se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.1.2. Determinación de la actividad ADN metiltransferasa

La determinación de la actividad ADN metiltransferasa total, de mantenimiento y *de novo*, se realizó en muestras experimentales de tejido glandular mamario y tumoral mediante un ensayo inmunoenzimático y colorimétrico con el kit “EpiQuik™ DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra Kit” (Epigentek). Se realizó en placas de 96 pocillos, en la base de los cuales se encontraba unido ADN rico en citosinas metilables. En cada placa se realizaron duplicados de las muestras analizadas, así como duplicados de controles positivo y negativo. Así, 5 µg de cada extracto proteico nuclear fueron llevados a un volumen final de 50 µl con tampón MU3 que contenía el donador de grupos metilos (Adomet). En los pocillos de control positivo se añadió 1 µl de tampón MU4 (enzima con actividad ADN metiltransferasa de mantenimiento y *de novo*) y 49 µl de tampón MU3. Mientras que en los pocillos de control negativo únicamente se añadieron 50 µl de tampón MU3. Una vez cargada la placa, ésta se incubó a 37°C durante 2 horas, período en el que tiene lugar la reacción enzimática donde las ADN metiltransferasas incorporan covalentemente el grupo metilo del donador “Adomet” al sustrato adherido a la base de la placa. Posteriormente, los pocillos fueron lavados e incubados con 50 µl de tampón MU5 (anticuerpo anti-5metilcitosina en dilución 1:1000) en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras realizar una serie de lavados, se añadió

a cada pocillo 50 µl de tampón MU6 (anticuerpo de detección en dilución 1:2000) y se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras lavar los pocillos, se añadió 50 µl de tampón MU7 (potenciador de señal), el cual también se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron los pocillos y se añadió 100 µl de tampón MU8 (solución de revelado) en oscuridad, incubándose la placa durante 5 minutos. Por último, se añadió 100 µl de tampón MU9 (solución de parada) y se realizó la lectura de la placa a 450 nm y a 655 nm (longitud de onda de referencia), calculando la diferencia entre ambas lecturas ($D.O._{450} - D.O._{655}$) para cada condición. Se calculó la media de los valores de cada muestra así como de los controles, con el fin de aplicar la fórmula mostrada a continuación, donde la cantidad de proteína correspondía a 5 µg de extracto nuclear y el tiempo de incubación a 2 horas.

$$\text{Actividad DNMT} \left(\frac{D.O.}{h \cdot mg} \right) = \frac{(D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ blanco})}{\text{Cantidad Proteína } (\mu\text{g}) \times \text{Tiempo Incubación (h)}} \times 1000$$

3.2. Determinación de los niveles globales de modificaciones postraduccionales de histonas

Se determinaron mediante Western Blot los niveles globales de modificaciones postraduccionales de la histona 4 (trimetilación de la lisina 20 -H4K20me³- y acetilación de la lisina 16 -H4K16ac-) así como de la histona 3 (dimetilación de la lisina 4 -H3K4me²- y trimetilación de la lisina 27 -H3K27me³-) en muestras experimentales de tejido glandular mamario y tumoral. En función del tejido y la proteína a detectar (Tabla 8), se prepararon 10-50 µg de extracto proteico nuclear en un volumen final de 20 µl añadiendo “Laemmli Buffer” (BioRad Laboratories) con β-mercaptoetanol al 5% en proporción 1:1. Las proteínas fueron desnaturalizadas por tratamiento a +90-+100°C durante 4 minutos y, posteriormente, separadas por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida comerciales “AnyKD™ Mini-Protean® TGX Stain-Free™ Precast Gels” (BioRad Laboratories) a 200 V durante 30 minutos. Estos geles contienen un compuesto, que al ser activado durante 5 minutos con luz ultravioleta, reacciona con los residuos de triptófano presentes en las proteínas produciendo fluorescencia. Tras la electroforesis, se realizó la transferencia del gel a una membrana de PVDF empleando el sistema “Trans-Blot® Turbo™ Transfer System” durante 10 minutos a

2.5 V y 1.3 mA. Una vez finalizada, se captó la imagen de fluorescencia de las proteínas transferidas a la membrana con el sistema “ChemiDoc™ XRS+” (BioRad Laboratories), imagen necesaria para la posterior cuantificación proteica. Seguidamente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, utilizando leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T 0.1% (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1% Tween-20) ó BSA al 5% en TBS-T 0.1%, en función de la proteína a detectar y se incubó con el anticuerpo primario específico (Tabla 8) durante 20 horas a +4°C y en agitación. Tras realizar tres lavados en TBS-T 0.1% y en agitación durante 5 minutos cada uno de ellos, se incubó la membrana con la solución de anticuerpo secundario de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:3000, preparada con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T 0.1%, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se realizaron tres lavados de la membrana en TBS-T 0.1% y se procedió a la detección por quimioluminiscencia mediante el sistema “Luminata™ Forte Western HRP Substrate” (Millipore), y utilizando el aparato “ChemiDoc™ XRS+” acoplado al programa informático “Image Lab™ Software” version 5.1 (BioRad Laboratories), el cual permitió la cuantificación densitométrica de las bandas detectadas. Paralelamente a la cuantificación de las bandas de proteína específicas, el sistema cuantificó la cantidad total de proteína cargada en cada carril a partir de la imagen de fluorescencia de proteína total transferida a la membrana. Por otro lado, a fin de comparar entre membranas (inter-ensayo), en todos los geles se cargaron dos carriles de una muestra control, consistente en un “pool” de proteína generada a partir de todas las muestras de tejido glandular mamario ó de tejido tumoral. Así, los valores densitométricos de las proteínas específicas fueron relativizados a la carga proteica del carril y, posteriormente, al promedio de los dos carriles de la muestra control. Finalmente, los niveles globales de las modificaciones postraduccionales de histonas estudiadas (H3K4me2, H3K27me3, H4K20me3 y H4K16ac) se expresaron de forma normalizada a la cantidad total de histona 3 ó histona 4, respectivamente.

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados y condiciones de los ensayos Western Blot para la determinación de los niveles globales de modificaciones postraduccionales de histonas. (GM: glándula mamaria; T: tejido tumoral)

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	PROTEÍNA (µg)		DILUCIÓN
		GM	T	
H3K4me2	Abcam	50	20	1:1000 (leche)
H3K27me3	Epigentek	50	20	1:1000 (BSA)
H3 total	Abcam	10	10	1:10000 (leche)
H4K20me3	Abcam	25	10	1:5000 (leche)
H4K16ac	Abcam	50	20	1:5000 (leche)
H4 total	Abcam	25	10	1:5000 (leche)

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Dado que los datos de cáncer no siguen una distribución normal y las varianzas son heterogéneas, se aplicó una estadística no paramétrica en todo el estudio para dar homogeneidad a los análisis estadísticos. Los programas estadísticos empleados fueron el IBM SPSS Statistics 20 y el Deducer (R version 3.1.2). En todos los estudios el nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO EN HUMANOS

Parámetros reproductivos, antropométricos y de estilo de vida

La evaluación de las diferencias en cuanto a los parámetros reproductivos y de estilo de vida entre la población de voluntarias sanas y de enfermas se realizó, en el caso de las variables continuas, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes, mientras que para el análisis de las variables categóricas se utilizó la prueba de la ji-cuadrado (χ^2). En ambos casos se empleó el programa estadístico “Deducer” (R version 3.1.2).

Determinación de marcadores dietéticos de ingesta lipídica

Los datos obtenidos en la determinación del perfil de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para la

comparación de dos muestras independientes. Por otro lado, la evaluación de la correlación existente entre estos datos y las variables nutricionales de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). En ambos análisis se utilizó el programa estadístico “Deducer” (R version 3.1.2).

2. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Datos cualitativos

Se utilizó la prueba de la ji-cuadrado (χ^2) para analizar los datos de la determinación de la metilación gen-específica por “MSP” tanto en el estudio en humanos como en muestras del modelo experimental.

Datos cuantitativos

En el estudio en humanos, el análisis de los resultados obtenidos en la determinación semi-cuantitativa por “COBRA” se realizó mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney utilizando el programa “IBM SPSS Statistics 20”. Por otro lado, los datos del análisis de la metilación global (LINE-1) y gen-específica (BRCA1, ESR1 y RASSF1A) por pirosecuenciación fueron analizados mediante el test no paramétrico de la suma de rangos de Wilcoxon para la comparación de dos muestras independientes, utilizando el programa estadístico “Deducer” (R version 3.1.2). Por último, el grado de asociación entre variables categóricas y datos cuantitativos se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y las correlaciones entre variables cuantitativas mediante el coeficiente de correlación de Spearman (ρ), empleando en ambos casos el programa “Deducer” (R version 3.1.2).

En el estudio en el modelo experimental, los resultados del análisis de la metilación global por “LUMA”, de la determinación de la actividad ADN metiltransferasa, de la pirosecuenciación de los genes RASSF1A y TIMP3, así como de las modificaciones postraduccionales de las histonas, fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis realizada con el programa “Deducer” (R version 3.1.2). En cuanto a los datos del estudio de expresión génica, éstos fueron analizados mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney utilizando el programa “IBM SPSS Statistics 20”. Por último, se empleó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) para correlacionar los datos moleculares entre sí, así como con los parámetros histopatológicos de los adenocarcinomas mamarios.

..... **RESULTADOS** ■

A. ESTUDIO EN HUMANOS

Los resultados presentados en este apartado forman parte de un proyecto multicéntrico actualmente en curso, tanto a nivel de recopilación de datos clínicos y nutricionales como de obtención de muestras biológicas de voluntarias sanas y enfermas de cáncer de mama. A pesar de que en el momento actual las poblaciones aún no son homogéneas y hay que incrementar el número de efectivos, a continuación se mostrarán los datos obtenidos hasta el momento.

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ANTROPOMÉTRICOS

Con el fin de caracterizar la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama se seleccionó, a parte de la edad, una serie de parámetros tanto reproductivos como antropométricos descritos como relevantes en dicho cáncer (Tabla 9).

Por lo que respecta a la edad en el momento de la incorporación al estudio, se hallaron diferencias significativas entre ambas poblaciones, presentando las enfermas mayor edad (mediana: 55,5 años) que las sanas (44 años). Por otro lado, no se encontraron diferencias entre sanas y enfermas en cuanto a la edad de aparición de la menarquia. En relación al estado ovárico, se observaron diferencias significativas entre las dos poblaciones, siendo el 65,30% de las voluntarias sanas mujeres premenopáusicas, mientras que en las pacientes con cáncer de mama el estado ovárico más abundante fue el postmenopáusico (55,10%). En este sentido, la edad de aparición de la menopausia no fue un parámetro diferencial entre ambas poblaciones, correspondiendo a 50 años de mediana en sanas y a 51 años en enfermas. En cuanto a otros parámetros relacionados con la reproducción (número de embarazos, edad en la primera gestación y práctica de lactancia materna) no se hallaron diferencias con relevancia estadística entre la población de voluntarias sanas y de pacientes. Por último, los valores de los parámetros antropométricos de índice de masa corporal (IMC) y ratio cintura-cadera fueron superiores en las pacientes con cáncer de mama.

Tabla 9. Parámetros reproductivos y antropométricos de los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama.

		SANAS	ENFERMAS	<i>p-value</i>
EDAD (años)	n	45	80	<0,001**
	m	44	55,50	
	M	42,60	57,40	
EDAD MENARQUIA (años)	n	48	79	0,592
	m	12	12	
	M	12,21	12,34	
ESTADO OVÁRICO				0,002**
premenopáusicas	n	32	27	
	%	65,30	34,60	
perimenopáusicas	n	1	8	
	%	2	10,30	
postmenopáusicas	n	16	43	
	%	32,70	55,10	
EDAD MENOPAUSIA (años)	n	16	47	0,243
	m	50	51	
	M	49,94	49,55	
NÚMERO EMBARAZOS	n	49	81	0,654
	m	1	1	
	M	1,22	1,40	
EDAD PRIMERA GESTACIÓN (años)	n	32	38	0,849
	m	28	26	
	M	27,91	26,42	
LACTANCIA MATERNA	n	30	38	0,179
	%	63,80	51,40	
IMC (Kg/m²)	n	24	58	<0,001**
	m	23,58	26,12	
	M	23,26	27,8	
RATIO CINTURA-CADERA	n	24	58	0,001**
	m	0,75	0,85	
	M	0,77	0,85	

n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, %: porcentaje respecto al total de la población, IMC: índice de masa corporal, **: diferencias significativas ($p < 0,05$).

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: ESTILO DE VIDA

La caracterización de los hábitos dietéticos y de estilo de vida se realizó mediante tres tipos de cuestionarios: de frecuencia de consumo de alimentos, de adherencia a la Dieta Mediterránea (ADM) y de actividad física (Tabla 10). En el caso de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, se realizó una selección de las variables nutricionales más relevantes por su implicación tanto en cáncer de mama como a nivel epigenético.

Por lo que respecta al hábito tabáquico, no se hallaron diferencias significativas entre la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama, siendo la mayoría de ellas mujeres no fumadoras. En relación al consumo de alcohol, se obtuvieron diferencias cercanas a la significación entre ambas poblaciones, observándose en las mujeres sanas mayores valores de ingesta de alcohol (2,15 g/día) que en las enfermas (1,42 g/día). La actividad física fue también más elevada en voluntarias sanas que en pacientes. Por otro lado, el grado de adherencia a la Dieta Mediterránea en ambas poblaciones fue de 8 puntos sobre 14.

Tabla 10. Características del estilo de vida de los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama.

		SANAS	ENFERMAS	<i>p-value</i>
HÁBITO TABÁQUICO				0,245
No fumadoras	n	29	55	
	%	59,20	69,60	
Ex-fumadoras	n	7	12	
	%	14,30	15,20	
Fumadoras ocasionales	n	5	0	
	%	10,20	0	
Fumadora < 10 cigarrillos/día	n	4	4	
	%	8,20	5,10	
Fumadora > 10 cigarrillos/día	n	4	8	
	%	8,20	10,10	
CONSUMO ALCOHOL (g/día)	n	24	58	0,088*
	m	2,15	1,42	
	M	4,74	4,89	
ACTIVIDAD FÍSICA (MET/semana)	n	24	58	0,008**
	m	23,68	15,12	
	M	25,40	19,13	
ADM	n	24	58	0,628
	m	8	8	
	M	7,92	7,60	

n: tamaño muestral, %: porcentaje respecto al total de la población, m: mediana, M: media, ADM: adherencia a la Dieta Mediterránea, **: diferencias significativas ($p < 0,05$), *: diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Tabla 10. Características del estilo de vida de los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama. (continuación)

		SANAS	ENFERMAS	<i>p-value</i>
FRECUENCIA CONSUMO				
Energía total (kcal/día)	n	24	58	0,105
	m	2519,75	2871,10	
	M	2559,92	2876,12	
Hidratos de carbono (g/día)	n	24	58	0,338
	m	271,38	294,4	
	M	271,91	299,08	
Proteína (g/día)	n	24	58	0,221
	m	109,62	108,08	
	M	104,35	114,29	
Lípidos (g/día)	n	24	58	0,036**
	m	108,91	131,87	
	M	113,52	132,05	
AG saturados	n	24	58	0,137
	m	32,37	39,03	
	M	32,98	37,84	
AG monoinsaturados	n	24	58	0,030**
	m	47,79	64,52	
	M	52,7	62,4	
AG poliinsaturados	n	24	58	0,092*
	m	14,85	18	
	M	16,4	19,6	
AG Omega 6	n	24	58	0,031**
	m	11,87	13,84	
	M	12,56	16,38	
AG Omega 3 (no marinos)	n	24	58	0,020**
	m	1,38	1,68	
	M	1,45	1,93	
AG Omega 3 (marinos)	n	24	58	0,775
	m	0,72	0,75	
	M	0,87	0,88	
Aceite de Oliva (g/día)	n	24	58	0,071*
	m	29,29	50	
	M	35,8	43,83	
Fibra (g/día)	n	24	58	0,085*
	m	23,3	27,42	
	M	24,74	29,77	
Vitaminas				
B2 (mg/día)	n	24	58	0,668
	m	2,18	2,26	
	M	2,24	2,39	
B6 (mg/día)	n	24	58	0,155
	m	2,41	2,59	
	M	2,41	2,70	
B9 (µg/día)	n	24	58	0,068*
	m	353,40	411,33	
	M	374,69	443,46	
B12 (µg/día)	n	24	58	0,217
	m	8,84	9,31	
	M	8,99	10,95	

n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, AG: ácidos grasos, **: diferencias significativas ($p < 0,05$), *: diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Respecto a la frecuencia de consumo de alimentos, los resultados mostraron que la ingesta calórica así como el consumo de hidratos de carbono y proteínas fue similar en voluntarias sanas y pacientes con cáncer de mama. En cuanto a los lípidos, se observó que la población de enfermas presentaba significativamente un mayor consumo de grasas totales. En este sentido, al analizar la ingesta según el tipo de lípido, se detectó que la cantidad diaria ingerida de ácidos grasos monoinsaturados totales, poliinsaturados totales, omega 6 y omega 3 de origen no marino fue superior en la población de enfermas de forma cercana a la significación estadística. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas al calcular la ratio PUFA n-6/PUFA n-3 entre sanas (mediana: 0,19) y enfermas (mediana: 0,17). Por otro lado, el consumo de aceite de oliva, principal grasa de la Dieta Mediterránea, así como el de fibra fue mayor en las pacientes ($0,05 < p < 0,1$). Por último, el consumo de vitaminas del tipo B₂, B₆, B₉ y B₁₂, caracterizadas por ser donadores de grupos metilo, también fue superior en enfermas, de forma cercana a la significación en el caso de la vitamina B₉ (folato).

Paralelamente a los cuestionarios nutricionales se determinó por cromatografía de gases la composición de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos como posible marcador molecular de la ingesta lipídica (Figura 25).

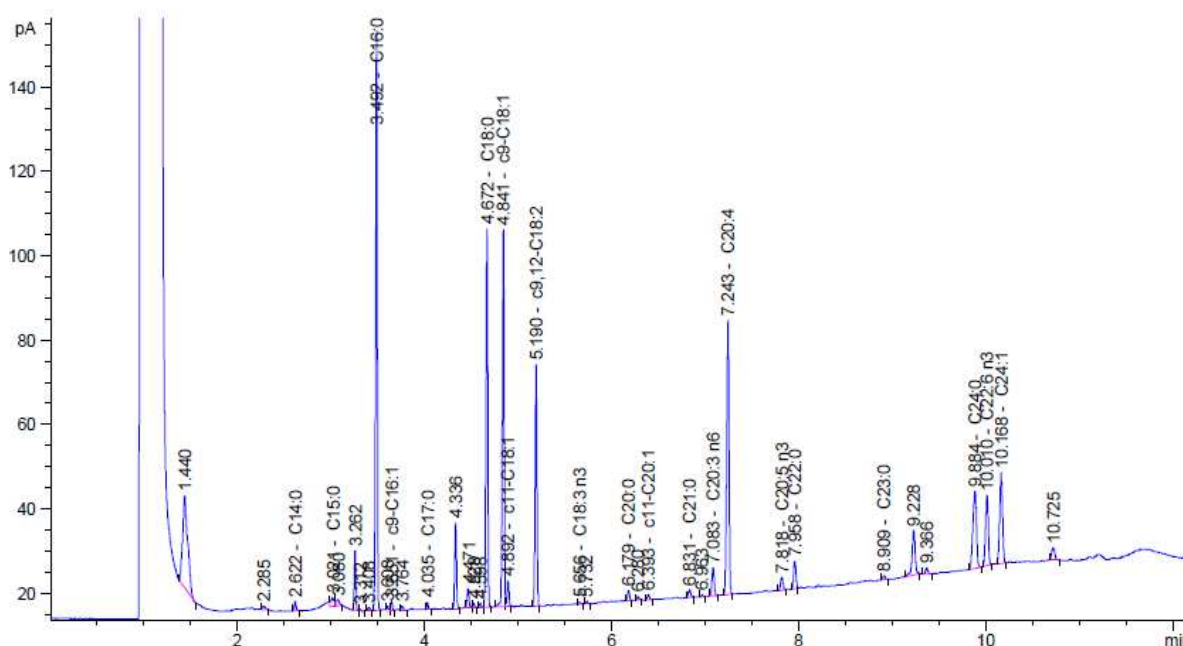
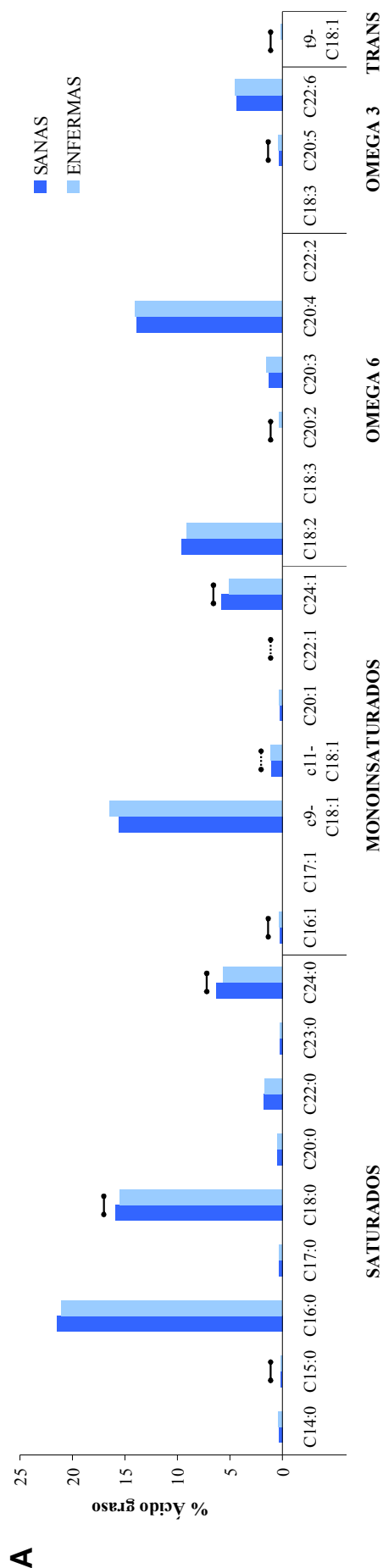


Figura 25. Cromatograma representativo de la determinación del perfil de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos.

En total se determinaron 25 ácidos grasos con isomería *cis* y un ácido graso *trans* (ácido elaídico, t9-C18:1), tal y como se puede observar en la Figura 26.

Los resultados obtenidos mostraron que los ácidos grasos mayoritarios en la membrana de los eritrocitos de sanas y enfermas, de entre el total de analizados, fueron los ácidos palmítico (C16:0, ≈21%), esteárico (C18:0, ≈16%), oleico (c9-C18:1, ≈16%), linoleico (C18:2, ≈9%) y araquidónico (C20:4, ≈14%).

Al comparar los valores detectados para cada ácido graso entre poblaciones, se obtuvo un incremento significativo en enfermas de cáncer de mama en los siguientes ácidos grasos: pentadecanoico (C15:0), palmitoleico (C16:1), eicosadienoico (C20:2), eicosapentanoico (EPA-C20:5) y elaídico (t9-C18:1); y de forma cercana a la significación en el caso del ácido vaccénico (c11-C18:1). Contrariamente, se detectó una disminución significativa en enfermas en los niveles de ácido esteárico (C18:0), lignocérico (C24:0) y nervónico (C24:1), y de forma cercana a la significación en los valores de ácido erúcico (C22:1) (Figura 26).

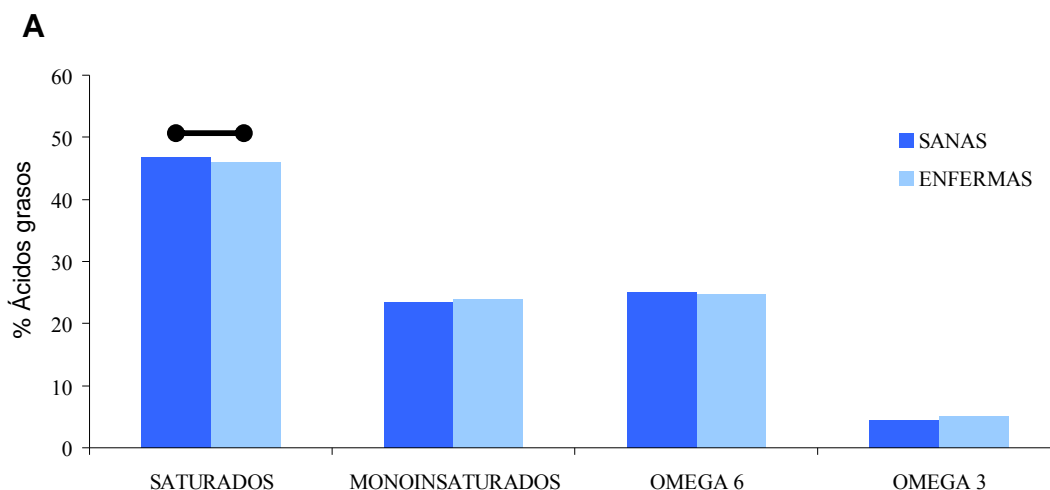


B

	SATURADOS			MONOINSATURADOS			OMEGA 6			OMEGA 3			TRANS												
	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C23:0	C24:0	C16:1	C17:1	e9- C18:1	C18:1	C18:2	C18:3	C20:2	C20:3	C20:4	C22:2	C18:3	C20:5	C22:6	∑9-C18:1		
n	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
m	0,39	0,15	21,48	0,33	15,91	0,50	1,80	0,25	6,34	0,25	0,00	15,60	1,08	0,29	0,00	5,80	9,61	0,00	0,00	13,85	0,00	0,00	0,31	4,38	
M	0,44	0,19	22,68	0,34	16,47	0,52	1,89	0,24	6,48	0,25	0,00	15,62	1,07	0,29	0,07	6,08	9,12	0,01	0,02	12,12	0,00	0,02	0,32	4,03	
DS	0,18	0,27	3,13	0,11	1,83	0,15	0,61	0,15	0,98	0,10	0,01	3,06	0,20	0,12	0,38	0,95	1,72	0,05	0,10	4,39	0,00	0,04	0,27	1,78	
CV	41,64	137,09	13,81	32,37	11,14	28,34	32,05	65,29	15,12	39,86	632,46	19,59	18,89	42,28	576,49	15,61	18,85	361,91	632,46	39,19	36,26	NA	252,89	82,90	44,12
n	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	
m	0,44	0,18	21,06	0,32	15,47	0,50	1,67	0,27	5,65	0,37	0,00	16,45	1,14	0,30	0,00	5,12	9,13	0,00	0,34	14,04	0,00	0,00	0,42	4,50	
M	0,46	0,20	21,02	0,32	15,29	0,52	1,68	0,24	5,59	0,39	0,00	17,62	1,19	0,32	0,06	5,18	9,13	0,03	0,32	14,99	0,02	0,03	0,48	4,48	
DS	0,24	0,12	1,70	0,07	1,35	0,13	0,40	0,11	1,33	0,17	0,02	5,68	0,24	0,14	0,15	1,05	1,54	0,07	0,17	4,40	2,03	0,14	0,06	0,32	
CV	53,00	60,66	8,06	21,08	8,80	25,30	23,86	46,40	23,85	43,60	450,65	32,23	20,00	44,51	230,23	20,23	16,84	215,69	52,92	26,76	14,76	712,87	184,94	66,92	26,82

Figura 26. Perfil de ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama. (A) Comparación de los porcentajes obtenidos para cada ácido graso entre ambas poblaciones (mediana). **(B)** Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

En la Figura 27 se muestran los ácidos grasos agrupados en función del tipo, observándose que del total de ácidos grasos presentes en la membrana de los eritrocitos, aproximadamente el 46% correspondieron a saturados, el 24% a monoinsaturados, el 25% a poliinsaturados del tipo omega 6 y el 5% restante a omega 3. A su vez, la comparación entre poblaciones de cada tipo de ácido graso puso de manifiesto un descenso significativo en los niveles de ácidos grasos saturados en enfermas.



B

		SATURADOS	MONOINSATURADOS	OMEGA 6	OMEGA 3
SANAS	n	40	40	40	40
	m	46,89	23,46	25,08	4,51
	M	49,49	23,42	22,68	4,40
	DS	6,32	3,37	6,20	1,98
	CV	12,77	14,40	27,32	44,98
ENFERMAS	n	57	57	57	57
	m	45,96	23,94	24,87	5,02
	M	45,39	24,81	24,80	5,00
	DS	2,66	5,51	2,73	1,41
	CV	5,85	22,23	11,01	28,24

Figura 27. Perfil de ácidos grasos agrupados en función del tipo en la membrana de los eritrocitos en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama. (A) Comparativa de los porcentajes obtenidos para cada familia entre ambas poblaciones (mediana). **(B)** Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Con el fin de evaluar la composición de ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos como posible marcador molecular de la ingesta lipídica, se realizaron correlaciones entre los datos obtenidos por cromatografía de gases y la cuantificación de la ingesta de lípidos a partir de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (Tablas 11-15).

Por lo que respecta a los **ácidos grasos saturados** (Tabla 11), en las enfermas de cáncer de mama se detectó una correlación positiva entre el consumo de lípidos totales así como de saturados y los niveles globales de ácidos grasos saturados en la membrana de los eritrocitos. En cuanto a los ácidos grasos individuales, se hallaron correlaciones positivas entre la ingesta lipídica total y de saturados y la presencia de ácido esteárico (C18:0), behénico (C22:0), tricosanoico (C23:0) y lignocérico (C24:0) en las membranas eritrocitarias. La ingesta de saturados en enfermas también correlacionó positivamente con los niveles de ácido margárico (C17:0), mientras que su asociación con el ácido palmítico (C16:0) fue inversamente proporcional. Por otro lado, el consumo de aceite de oliva correlacionó de forma negativa con los niveles de ácido araquídico (C20:0) en la membrana de los eritrocitos de las voluntarias sanas.

En cuanto a los **ácidos grasos monoinsaturados** (Tabla 12), los niveles globales de monoinsaturados en la membrana de los eritrocitos correlacionaron positivamente con la ingesta de ácidos grasos saturados en las voluntarias sanas, mientras que en enfermas mostraron una asociación positiva con la ingesta de omega 3 marinos, y negativa con el consumo de lípidos totales, saturados y monoinsaturados. En relación a los ácidos grasos individuales, los niveles de ácido palmitoleico (C16:1) en la membrana de los eritrocitos correlacionaron positivamente con la ingesta de lípidos totales, saturados y monoinsaturados, omega 6 y omega 3 (no marinos) en la población de sanas. En el caso de las enfermas, se obtuvieron correlaciones negativas entre la presencia de ácido palmitoleico (C16:1) en la membrana de los eritrocitos y el consumo de lípidos totales y de ácidos grasos saturados. Por otro lado, los niveles de ácido oleico (c9-C18:1) y vaccénico (c11-C18:1) en la membrana de los eritrocitos de las enfermas correlacionaron negativamente con la ingesta de lípidos totales, saturados y monoinsaturados, y de manera positiva con la ingesta de omega 3 marino. Contrariamente, en las voluntarias sanas los niveles de ácido oleico (c9-C18:1) en las membranas de los eritrocitos correlacionaron positivamente con el consumo de ácidos grasos saturados. Por último, no se hallaron asociaciones con relevancia estadística entre el consumo de aceite de oliva y los niveles de ácidos grasos monoinsaturados totales ni individuales.

En el caso de los **ácidos grasos poliinsaturados omega 6** (Tabla 13), en enfermas la ingesta de lípidos totales, saturados y monoinsaturados mostró una asociación positiva con los

niveles globales de omega 6 en la membrana de los eritrocitos, mientras que la ingesta de omega 3 marino correlacionó de forma negativa con dichos niveles. En referencia a los ácidos grasos individuales, en las pacientes la ingesta de lípidos totales y de saturados correlacionó positivamente con los niveles de ácido diomo- γ -linolenico (DGLA- C20:3) en la membrana de los eritrocitos. A su vez, la ingesta de saturados en dicha población, también correlacionó de forma positiva con los niveles de ácido eicosadienoico (C20:2) y de ácido araquidónico (C20:4). Por otro lado, el ácido docosadienoico (C22:2) correlacionó positivamente con la ingesta de poliinsaturados totales, de omega 6, de omega 3 (no marino) y de aceite de oliva en las pacientes con cáncer de mama.

En relación a los **ácidos grasos poliinsaturados omega 3** (Tabla 14), en la población de mujeres afectadas de cáncer de mama se halló una correlación positiva entre los niveles globales de omega 3 en la membrana de los eritrocitos y la ingesta de ácidos grasos saturados. En cuanto a los ácidos grasos individuales, en enfermas la presencia de ácido docosahexaenoico (DHA-C22:6) en la membrana de los eritrocitos presentó una asociación positiva con el consumo de lípidos totales y de ácidos grasos saturados. Por otro lado, la ingesta de omega 3 de origen no marino no correlacionó ni con la presencia de ácido α -linolénico (C18:3) ni de omega 3 totales en la membrana de los eritrocitos. Por su parte, el consumo de omega 3 de origen marino en las pacientes presentó una asociación positiva con los niveles de ácido eicosapentanoico (EPA-C20:5), y de forma negativa con los de ácido α -linolénico (C18:3). Por último, la ingesta de aceite de oliva en enfermas fue inversamente proporcional a la detección de ácido α -linolénico (C18:3) en la membrana de los eritrocitos.

En referencia al ácido graso con isomería *trans* (Tabla 15), en la población de enfermas los niveles de ácido elaídico (t9-C18:1) en la membrana de los eritrocitos correlacionaron positivamente con el consumo tanto de lípidos totales como de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

	LÍPIDOS TOTALES		SATURADOS		MONOINSATURADOS		POLINSATURADOS		OMEGA 6		OMEGA 3 (NO MARINOS)		OMEGA 3 (MARINOS)		ACEITE OLIVA	
	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS
MEMBRANA ERITROCITOS																
C14:0	rho	-0,154	0,321	-0,164	0,239	-0,161	0,329	-0,181	0,280	-0,163	0,198	-0,233	-0,280	0,067	0,057	-0,068
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,318	0,156	0,287	0,296	0,296	0,145	0,237	0,218	0,292	0,388	0,128	0,219	0,666	0,804	0,662
(Ác. mirístico)																
C15:0	rho	0,045	-0,071	-0,003	0,092	0,098	0,167	-0,180	0,085	-0,158	0,135	-0,223	0,134	0,028	0,151	0,186
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,847	0,928	0,758	0,985	0,524	0,469	0,240	0,712	0,303	0,561	0,145	0,562	0,855	0,514	0,225
(Ác. pentadecanoico)																
C16:0	rho	0,009	-0,196	0,024	-0,119	0,046	0,140	0,003	0,119	0,007	-0,019	-0,08	-0,298	-0,029	-0,088	-0,074
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,968	0,201	0,915	0,440	0,840	0,544	0,985	0,606	0,964	0,933	0,614	0,188	0,849	0,705	0,633
(Ác. palmítico)																
C17:0	rho	-0,076	0,185	0,096	0,116	-0,103	0,047	-0,056	-0,053	-0,076	-0,034	0,046	-0,328	0,003	-0,204	0,036
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,741	0,228	0,678	0,453	0,658	0,840	0,719	0,818	0,625	0,884	0,767	0,146	0,981	0,375	0,817
(Ác. margárico)																
C18:0	rho	-0,129	0,444	0,089	0,482	-0,176	0,316	0,153	0,007	0,204	-0,063	0,159	-0,399	0,166	-0,263	-0,027
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,575	0,002**	0,699	0,001**	0,444	0,036**	0,843	0,973	0,184	0,784	0,302	0,073*	0,400	0,248	0,859
(Ác. esteárico)																
C20:0	rho	-0,313	0,003	-0,115	-0,034	-0,344	-0,002	0,060	-0,201	0,018	-0,245	0,018	-0,525	0,166	-0,377	0,072
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,167	0,985	0,617	0,827	0,126	0,989	0,698	0,382	0,905	0,283	0,903	0,014**	0,280	0,091*	0,642
(Ác. araquídico)																
C22:0	rho	-0,208	0,311	-0,039	0,366	-0,279	0,296	0,005	-0,134	0,032	-0,091	-0,034	-0,486	-0,024	-0,278	0,122
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,366	0,040**	0,867	0,014**	0,220	0,050**	0,975	0,563	0,834	0,695	0,828	0,025**	0,878	0,223	0,429
(Ác. behénico)																
C23:0	rho	0,275	0,305	0,284	0,385	0,227	0,268	0,042	0,339	0,068	0,395	0,111	-0,018	-0,065	0,054	0,169
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,228	0,044**	0,212	0,009**	0,323	0,077**	0,788	0,133	0,657	0,076*	0,471	0,936	0,674	0,817	0,273
(Ác. tricosenoico)																
C24:0	rho	-0,031	0,332	0,151	0,447	-0,113	0,254	0,116	-0,083	0,173	0,045	0,200	-0,322	-0,129	-0,152	-0,031
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,893	0,027**	0,511	0,002**	0,626	0,096*	0,454	0,720	0,260	0,845	0,192	0,154	0,402	0,510	0,844
(Ác. lignocérico)																
TOTAL SATURADOS	rho	-0,119	0,377	0,026	0,401	-0,141	0,323	0,160	-0,076	0,242	-0,058	0,120	-0,445	-0,203	-0,205	0,054
	n	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44
	p-value	0,606	0,011**	0,911	0,007**	0,540	0,032**	0,298	0,741	0,113	0,801	0,437	0,043**	0,187	0,372	0,729

Tabla 11. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos saturados en la membrana de los eritrocitos. (rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

	LÍPIDOS TOTALES		SATURADOS		MONOINSATURADOS		POLINSATURADOS		OMEGA 6		OMEGA 3 (NO MARIÑOS)		OMEGA 3 (MARIÑOS)		ACEITE OLIVA	
	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS
MEMBRANA ERITROCITOS																
	rho	-0,271	0,454	-0,345	-0,221	0,536	-0,008	0,425	-0,035	0,41	-0,061	0,187	0,106	0,328	0,041	
C16:1	n	44	21	44	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	
(Ác. palmítico)	<i>p-value</i>	0,075*	0,038**	0,022**	0,148	0,012**	0,954	0,055*	0,064*	0,696	0,415	0,495	0,147	0,792		
C17:1	rho	-0,008	NA	-0,008	-0,008	NA	0,044	NA	0,044	NA	0,059	NA	0,007	NA	0,047	
(Ác. margaroleico)	<i>p-value</i>	NA	NA	NA	0,957	NA	0,775	NA	0,775	NA	0,703	NA	0,961	NA	0,764	
e9-C18:1	rho	-0,435	0,406	-0,473	-0,366	0,222	-0,013	0,193	-0,234	0,191	-0,154	0,050	0,286	0,162	-0,086	
(Ác. oleico)	<i>p-value</i>	0,003**	0,067*	0,001**	0,014**	0,333	0,370	0,401	0,127	0,407	0,317	0,829	0,059*	0,482	0,581	
e11-C18:1	rho	-0,403	-0,029	-0,502	-0,314	-0,174	-0,090	-0,219	-0,199	-0,225	-0,122	-0,245	0,278	-0,153	-0,029	
(Ác. vacénico)	<i>p-value</i>	0,006**	0,897	<0,001**	0,038**	0,451	0,558	0,339	0,193	0,327	0,429	0,285	0,067*	0,508	0,848	
C20:1	rho	-0,143	0,226	-0,044	-0,206	0,148	-0,164	0,259	-0,178	0,067	-0,144	-0,273	0,143	0,023	-0,237	
(Ác. gondoico)	<i>p-value</i>	0,355	0,324	0,777	0,180	0,521	0,288	0,258	0,246	0,771	0,350	0,231	0,355	0,919	0,121	
C22:1	rho	0,019	NA	0,037	0,055	NA	-0,118	NA	-0,076	NA	-0,022	NA	0,057	NA	0,086	
(Ác. erúico)	<i>p-value</i>	NA	NA	NA	0,721	NA	0,443	NA	0,623	NA	0,884	NA	0,713	NA	0,577	
C24:1	rho	0,111	0,168	0,232	0,072	0,288	0,032	0,245	0,037	0,236	0,143	0,020	0,046	0,211	-0,124	
(Ác. nervónico)	<i>p-value</i>	0,472	0,464	0,129	0,639	0,205	0,837	0,283	0,809	0,302	0,355	0,931	0,766	0,358	0,421	
TOTAL	rho	-0,444	0,393	-0,459	-0,394	0,318	-0,138	0,345	-0,244	0,317	-0,124	0,001	0,337	0,231	-0,125	
MONOINSATURADOS	<i>p-value</i>	0,002**	0,077*	0,002**	0,008**	0,159	0,372	0,125	0,111	0,162	0,423	0,995	0,025**	0,313	0,419	

Tabla 12. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos monoinsaturados en la membrana de los eritrocitos. (rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, *p-value*: significación estadística). **: correlaciones significativas ($p < 0,05$), *: correlaciones cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$). En verde se indican las correlaciones positivas con $p < 0,1$ y en rojo las negativas.

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

MEMBRANA ERITROCITOS	LÍPIDOS TOTALES		SATURADOS		MONOINSATURADOS		POLINSATURADOS		OMEGA 6		OMEGA 3 (NO MARINOS)		OMEGA 3 (MARINOS)		ACEITE OLIVA	
	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS
C18:2 (Ác. linoleico)	rho	-0,037	0,185	-0,235	0,119	0,007	0,187	0,068	0,085	0,026	0,121	-0,029	-0,015	0,284	-0,131	0,002
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		0,871	0,229	0,305	0,440	0,973	0,224	0,767	0,583	0,911	0,433	0,897	0,923	0,211	0,395	0,993
C18:3 (Ác. γ-linoleico)	rho	0,074	0,168	-0,111	0,229	0,074	0,156	0,258	0,034	0,111	0,155	0,295	-0,107	0,258	-0,233	0,228
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		0,750	0,273	0,633	0,134	0,750	0,310	0,257	0,827	0,632	0,316	0,194	0,488	0,257	0,128	0,318
C20:2 (Ác. eicosadienoico)	rho	NA	0,177	NA	0,317	NA	0,082	NA	-0,033	NA	0,051	NA	0,031	NA	-0,075	NA
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		NA	0,250	NA	0,036**	NA	0,594	NA	0,828	NA	0,743	NA	0,841	NA	0,629	NA
C20:3 (DGLA)	rho	0,217	0,253	0,004	0,288	0,245	0,124	0,170	0,084	0,144	0,175	0,178	0,034	0,217	-0,047	0,292
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		0,345	0,097*	0,986	0,057*	0,283	0,421	0,461	0,586	0,533	0,256	0,440	0,826	0,343	0,761	0,198
C20:4 (Ác. araquidónico)	rho	-0,091	0,231	-0,132	0,301	-0,087	0,217	-0,183	-0,042	-0,113	0,007	-0,104	-0,042	0,171	-0,212	-0,032
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		0,695	0,131	0,567	0,046**	0,707	0,156	0,425	0,785	0,626	0,962	0,654	0,786	0,459	0,167	0,889
C22:2 (Ác. docosadienoico)	rho	NA	0,062	NA	0,0004	NA	0,079	NA	0,255	NA	0,255	NA	0,256	NA	-0,010	NA
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		NA	0,689	NA	0,998	NA	0,608	NA	0,095*	NA	0,092*	NA	0,948	NA	0,948	NA
TOTAL OMEGA 6	rho	-0,174	0,325	-0,282	0,358	-0,127	0,313	-0,178	0,040	-0,183	0,148	-0,156	-0,027	0,207	-0,359	-0,064
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21
<i>p-value</i>		0,450	0,031**	0,216	0,017**	0,582	0,038**	0,438	0,795	0,427	0,336	0,499	0,862	0,367	0,016**	0,784

Tabla 13. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 6 en la membrana de los eritrocitos. (rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, *p-value*: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

	LÍPIDOS TOTALES		SATURADOS		MONOINSATURADOS		POLINSATURADOS		OMEGA 6		OMEGA 3 (NO MARINOS)		OMEGA 3 (MARINOS)		ACEITE OLIVA	
	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS
MEMBRANA ERITROCITOS	rho	-0,252	-0,103	-0,005	0,088	-0,207	-0,165	-0,337	-0,238	-0,245	-0,168	-0,149	-0,024	-0,365	-0,251	-0,266
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	44
	<i>p-value</i>	0,271	0,507	0,982	0,566	0,368	0,284	0,135	0,120	0,284	0,274	0,518	0,876	0,103	0,076*	0,081*
C18:3 (Ác. α-linoléico)	rho	0,061	0,096	-0,050	0,191	0,059	0,005	0,128	-0,019	0,013	-0,054	0,054	0,095	0,240	0,074	-0,176
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	44
	<i>p-value</i>	0,793	0,535	0,829	0,213	0,797	0,972	0,578	0,902	0,954	0,728	0,816	0,541	0,294	0,749	0,253
C20:5 (EPA)	rho	-0,004	0,268	-0,158	0,349	-0,025	0,225	0,058	0,031	-0,084	0,038	-0,053	0,126	0,293	0,190	0,008
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	44
	<i>p-value</i>	0,986	0,078*	0,492	0,020**	0,911	0,142	0,801	0,839	0,716	0,805	0,819	0,415	0,196	0,408	0,956
TOTAL OMEGA 3	rho	-0,104	0,234	-0,223	0,342	-0,117	0,161	-0,083	0,015	-0,204	0,0006	-0,158	0,111	0,194	0,085	-0,085
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	44
	<i>p-value</i>	0,654	0,126	0,330	0,023**	0,614	0,296	0,722	0,920	0,375	0,996	0,493	0,475	0,400	0,556	0,713

Tabla 14. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en la membrana de los eritrocitos. (rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, *p-value*: significación estadística). **: correlaciones significativas ($p < 0,05$), *: correlaciones cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$). En verde se indican las correlaciones positivas con $p < 0,1$ y en rojo las negativas.

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

	LÍPIDOS TOTALES		SATURADOS		MONOINSATURADOS		POLINSATURADOS		OMEGA 6		OMEGA 3 (NO MARINOS)		OMEGA 3 (MARINOS)		ACEITE OLIVA	
	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS	SANAS	ENFERMAS
MEMBRANA ERITROCITOS	rho	-0,147	0,284	-0,073	0,419	-0,147	0,263	-0,332	0,031	-0,258	0,077	-0,148	0,076	-0,148	0,019	0,090
	n	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	21	44	44
	<i>p-value</i>	0,523	0,061*	0,750	0,005**	0,523	0,084*	0,141	0,841	0,257	0,619	0,523	0,624	0,523	0,935	0,561

Tabla 15. Correlación entre la ingesta de lípidos obtenida de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la cuantificación del ácido graso con isomería *trans* (ácido eláidico) en la membrana de los eritrocitos. (rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, *p-value*: significación estadística). **: correlaciones significativas ($p < 0,05$), *: correlaciones cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$). En verde se indican las correlaciones positivas con $p < 0,1$.

3. ESTUDIO EPIGENÉTICO EN HUMANOS: METILACIÓN DEL ADN

El estudio del estado de metilación del ADN se basó tanto en la determinación de los niveles de metilación global del genoma, como en el análisis de la metilación gen-específica de un conjunto de genes de interés. Todo ello fue realizado en muestras de sangre periférica (elementos formes) de voluntarias sanas y, de elementos formes, glándula mamaria y tumor de pacientes con cáncer de mama.

3.1. Determinación de los niveles de metilación global del genoma

La amplificación por PCR de secuencias repetitivas de tipo LINE-1 y su posterior análisis por pirosecuenciación permitió obtener una estimación de los niveles de metilación global del ADN en las muestras humanas (Figura 28).

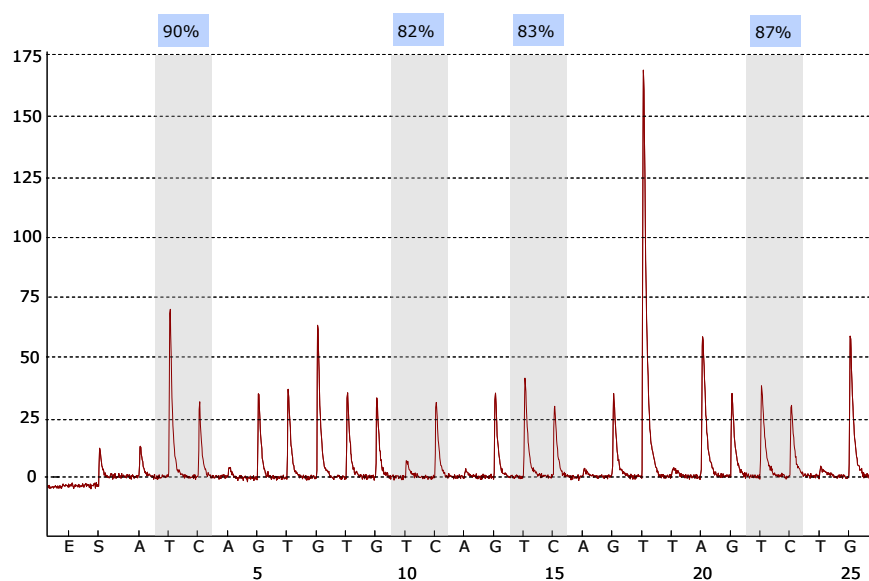


Figura 28. Pirograma representativo de la determinación de la metilación global del ADN en las muestras humanas. Enmarcado en color azul se indica el grado de metilación (%) de cada una de las posiciones CpG analizadas.

Tal y como se muestra en la Figura 29, los resultados obtenidos en elementos formes de sangre periférica mostraron un incremento cercano a la significación en el grado de metilación global en la población de enfermas de cáncer de mama respecto a las sanas. Por otro lado, se detectó un descenso de la metilación genómica en tumor respecto a glándula mamaria. Al comparar entre sangre periférica y tejido mamario en la población de enfermas, se observó

una menor metilación global en los tejidos mamarios (glándula mamaria y tumor) en relación a los elementos formes.

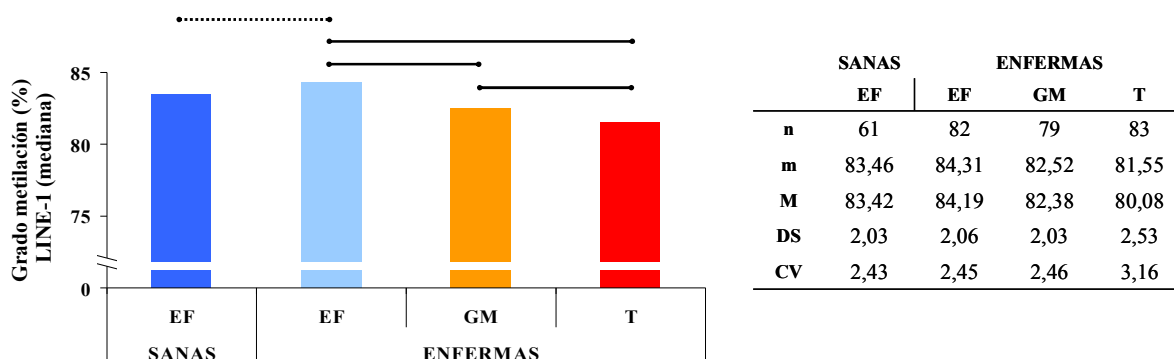


Figura 29. Grado de metilación global del ADN (% metilación de secuencias LINE-1) en los distintos tejidos. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

3.2. Determinación cualitativa de la metilación gen-específica

Se determinó el estado de metilación de forma cualitativa por “MSP” de 12 genes de interés implicados en las características adquiridas por las células neoplásicas (“hallmarks” del cáncer) ([3973], [7349]) (véase la Figura 17 del apartado B1.3.1 de Material y Métodos).

En este sentido, se analizó el alelo metilado de los 12 genes, así como el no metilado de 8 de ellos. Así, el 100% de las muestras analizadas presentaron el alelo no metilado para los genes BRCA1, p16, RARβ2, ESR1, PRB, RASSF1A, NES1 y CDH1. En cuanto a los alelos metilados, la frecuencia de detección de dichos alelos dependió tanto del gen en estudio como de la población (sanas ó enfermas) y del tejido analizado (elementos formes, glándula mamaria ó tumor), tal y como se puede observar en la Figura 30. Por lo que respecta a los genes BRCA1, ESR1 y p16, no se analizaron todas las muestras disponibles de los diferentes tejidos por motivos metodológicos. Por esta razón, y considerando la relevancia de los genes BRCA1 y ESR1 en cáncer de mama ([6609]), se consideró de interés ampliar el estudio de la metilación de dichos genes mediante pirosecuenciación, tal y como se comentará posteriormente.

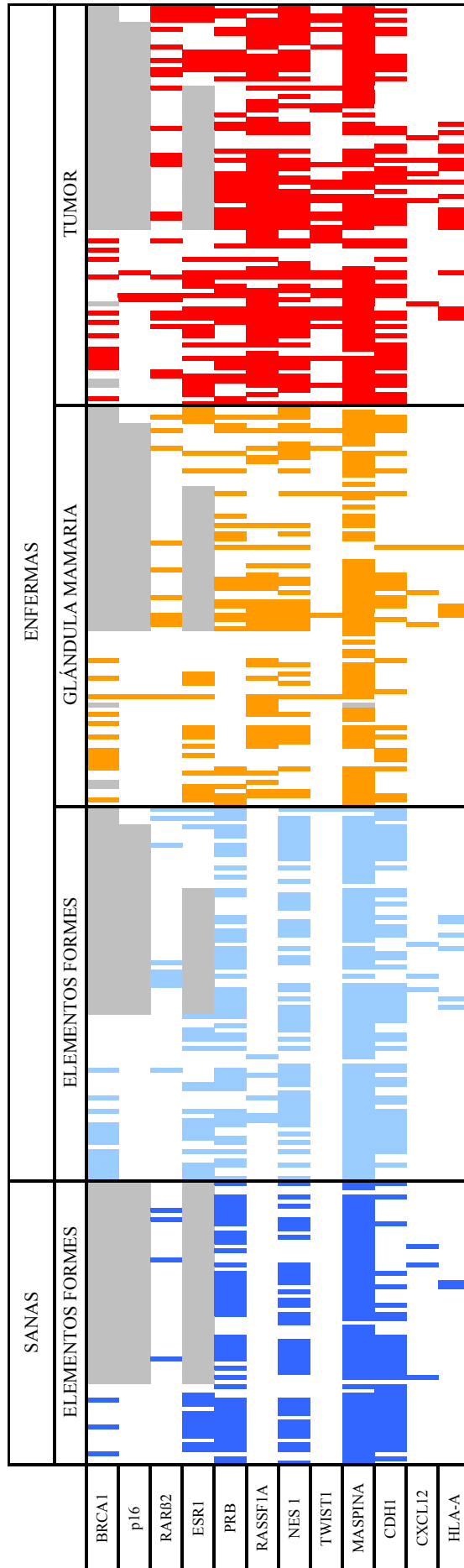


Figura 30. Distribución de la detección por “MSP” del alelo metilado de los diferentes genes de interés. Cada columna corresponde a una muestra y cada fila a un gen de estudio. La detección del alelo metilado se indica en color azul oscuro para elementos formes de voluntarias sanas, en azul claro para elementos formes de enfermas de cáncer de mama y, en naranja y rojo para muestras de glándula mamaria y tumor de dichas enfermas, respectivamente. La ausencia de detección del alelo metilado se indica en color blanco y la tonalidad grisácea corresponde a muestras no analizadas por “MSP” para dicho gen.

Perfiles de detección de metilación en elementos formes

Las frecuencias de metilación obtenidas en muestras de elementos formes de sangre periférica de voluntarias sanas se muestran en la Figura 31-A. Se observó una gran variabilidad en función del gen analizado, desde ausencia de metilación para los genes p16, RASSF1A y TWIST1, frecuencias bajas de metilación en el caso de los genes BRCA1, RARβ2, CXCL12 y HLA-A y, porcentajes de detección del alelo metilado elevados para los genes ESR1, PRB, NES1, MASPINA y CDH1. En el caso de las muestras de elementos formes de las pacientes (Figura 31-B), el perfil fue similar al de las sanas, observándose pequeñas variaciones en los genes RARβ2, PRB, NES1, MASPINA, CDH1, CXCL12 y HLA-A. A diferencia de las sanas, se detectó metilación de los genes RASSF1A y TWIST1 en elementos formes de las pacientes con cáncer de mama.

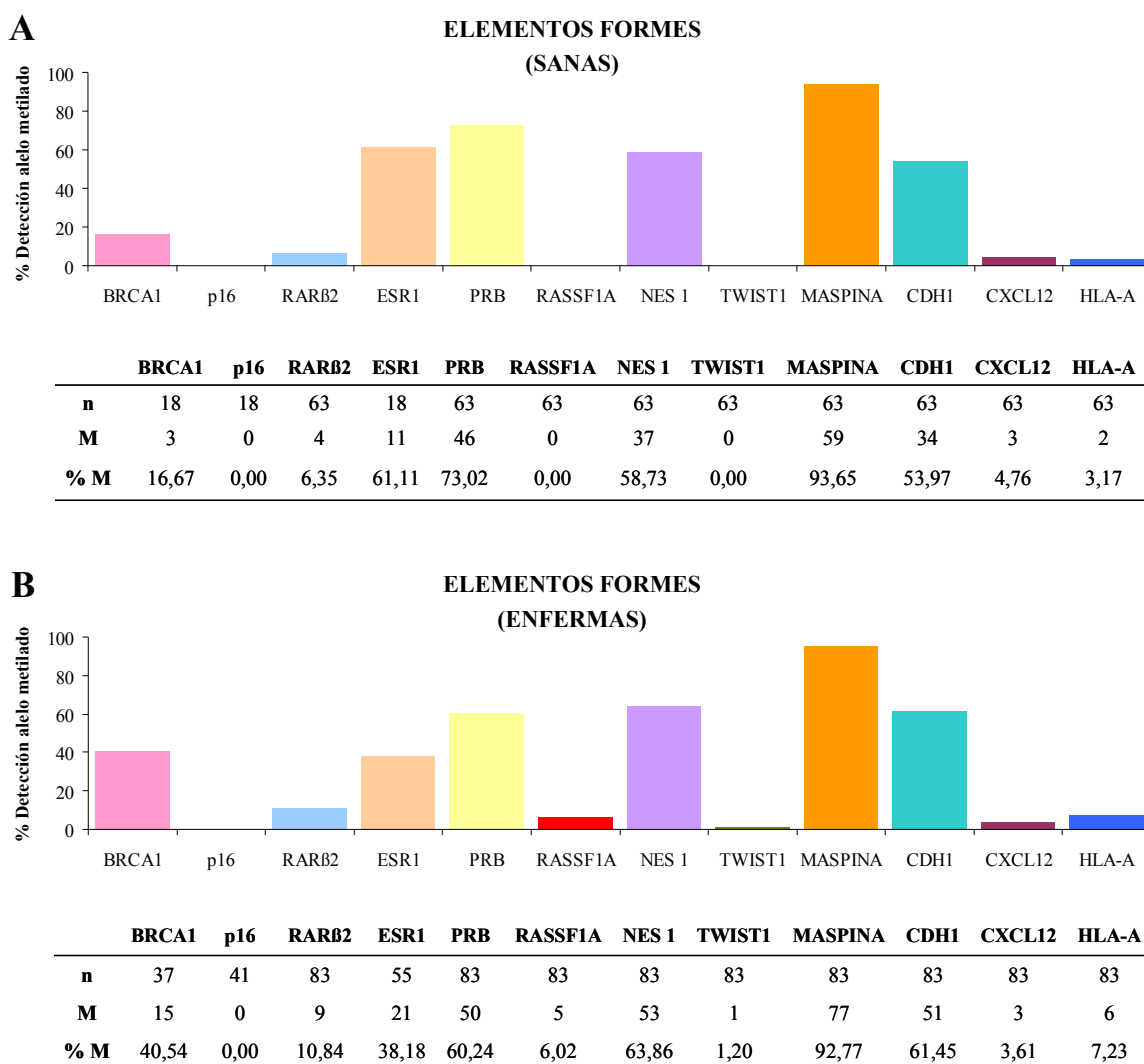


Figura 31. Determinación cualitativa por “MSP” de la metilación de los diferentes genes de interés en muestras de elementos formes de voluntarias sanas (A) y de enfermas de cáncer de mama (B). n: tamaño muestral, M: número de muestras con alelo metilado, %M: porcentaje de detección del alelo metilado.

Perfiles de detección de metilación en tejido mamario

Las frecuencias de metilación obtenidas para los 12 genes de estudio en muestras de glándula mamaria y tumor se detallan en la Figura 32-A y 32-B, respectivamente. Al comparar los perfiles de ambos tejidos se observó que las frecuencias de metilación fueron superiores en tumor en todos los genes analizados.

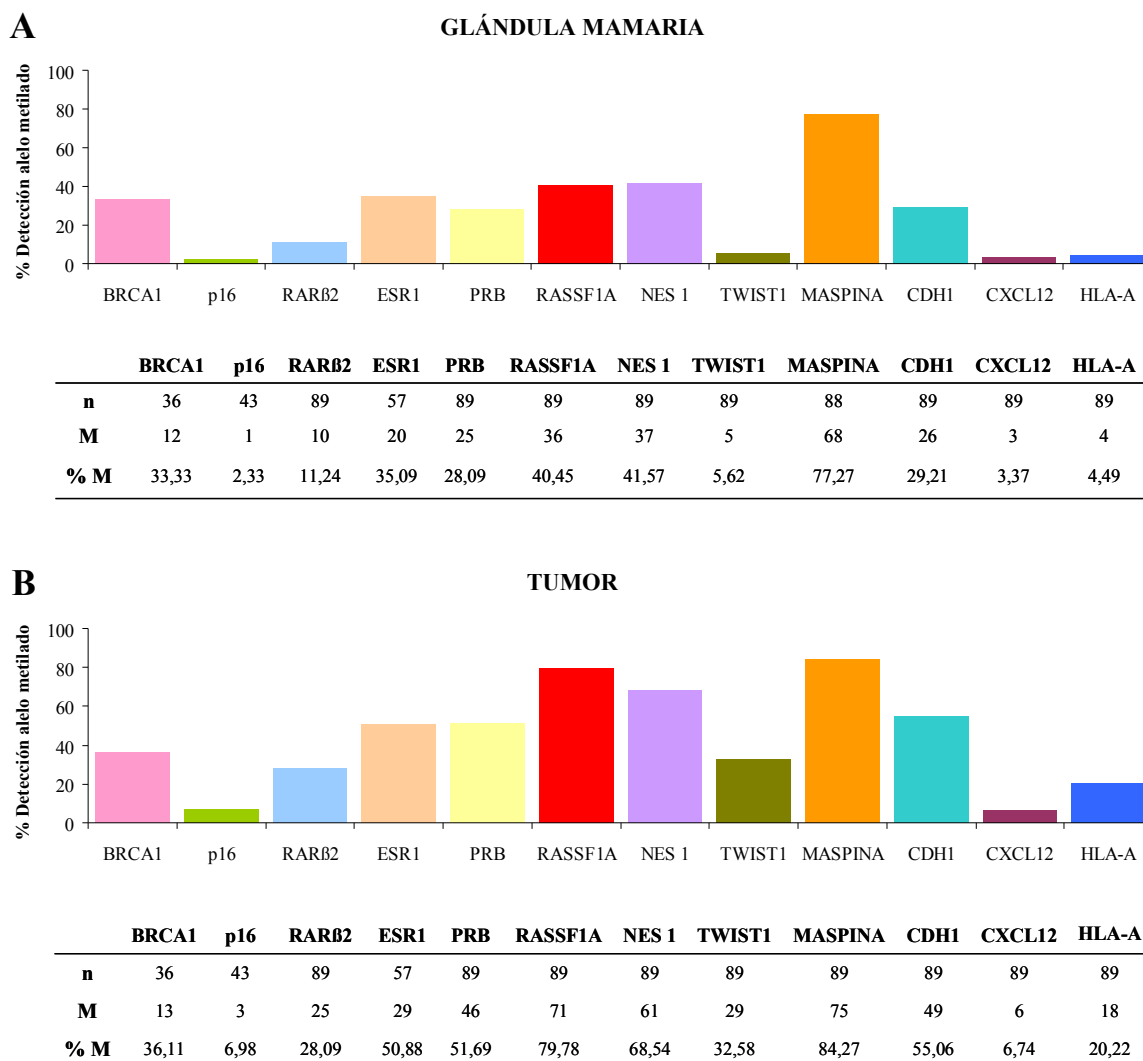


Figura 32. Determinación cualitativa por “MSP” de la metilación de los diferentes genes de interés en muestras de glándula mamaria (A) y tumor (B). n: tamaño muestral, M: número de muestras con alelo metilado, %M: porcentaje de detección del alelo metilado.

Las comparaciones específicas para cada gen se indican en el siguiente apartado.

3.2.1. Genes implicados en regulación de la capacidad proliferativa ilimitada: BRCA1, p16 y RAR β 2

Gen BRCA1

En referencia al gen BRCA1, se obtuvo un incremento cercano a la significación en la detección de metilación en elementos formes de las pacientes con cáncer de mama (40,54% muestras con alelo metilado) en comparación con la población de voluntarias sanas (16,67%). No se observaron diferencias significativas entre la frecuencia de metilación en glándula mamaria (33,33%) y tumor (36,11%). La comparación entre los resultados obtenidos en ambos tejidos (sangre periférica y tejido mamario) en la población de enfermas tampoco mostró diferencias significativas (Figura 33).

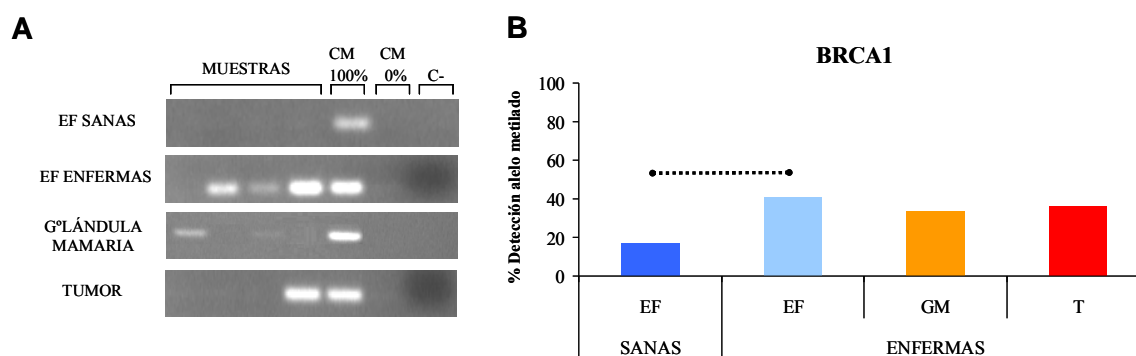


Figura 33. Determinación cualitativa de la metilación del gen BRCA1 por "MSP" en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen BRCA1 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Gen p16

En muestras de elementos formes de sangre periférica no se detectó alelo metilado para el gen p16 en ninguna de las dos poblaciones (sanas y enfermas). Sin embargo, tanto en glándula mamaria como en tumor de las pacientes se detectó la presencia de dicho alelo, aunque con una frecuencia de metilación muy baja (glándula mamaria: 2,33% y tumor: 6,98%). Las diferencias entre estos tejidos no fueron significativas, pese a que el número de muestras que presentaron alelo metilado fue mayor en tejido tumoral. Al comparar los resultados obtenidos entre sangre periférica y tejido glandular, se obtuvo un incremento cercano a la significación en la frecuencia de metilación del gen p16 en tumor respecto a elementos formes de las pacientes con cáncer de mama (Figura 34).

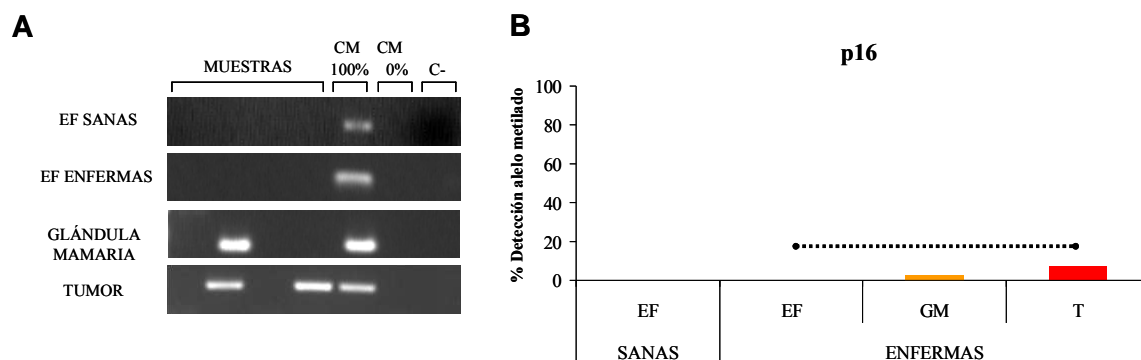


Figura 34. Determinación cualitativa de la metilación del gen p16 por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen p16 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Gen RARβ2

Los resultados obtenidos en elementos formes no mostraron diferencias significativas entre las voluntarias sanas (6,35%) y las enfermas de cáncer de mama (10,84%). Los valores de frecuencia de metilación fueron significativamente superiores en tejido tumoral (28,09%) que en glándula mamaria (11,24%). Al comparar entre sangre periférica y tejido mamario, se observó que el porcentaje de detección de metilación del gen RARβ2 incrementó progresivamente entre elementos formes, glándula mamaria y tumor de las pacientes. En este sentido, la frecuencia de metilación de las muestras tumorales fue significativamente superior a la frecuencia obtenida en glándula mamaria y en elementos formes (Figura 35).

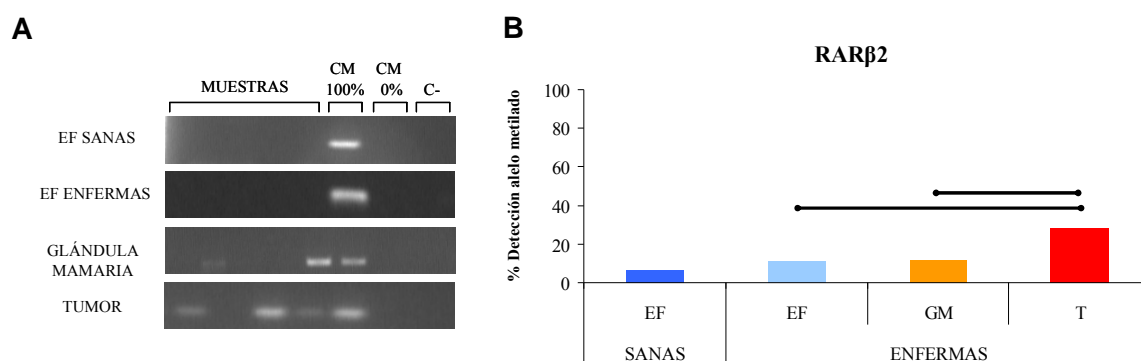


Figura 35. Determinación cualitativa de la metilación del gen RARβ2 por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen RARβ2 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2.2 Genes implicados en autosuficiencia en señales de proliferación: ESR1, PRB y RASSF1A

Gen ESR1

En sangre periférica, se obtuvo un descenso cercano a la significación en la frecuencia de metilación del gen ESR1 en elementos formes de las enfermas (38,18%) en comparación con las voluntarias sanas (61,11%). Además, se observó un incremento cercano a la significación en la detección del alelo metilado en muestras de tumor (50,88%) respecto a glándula mamaria (35,09%). La comparación entre sangre periférica y tejido mamario no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 36).

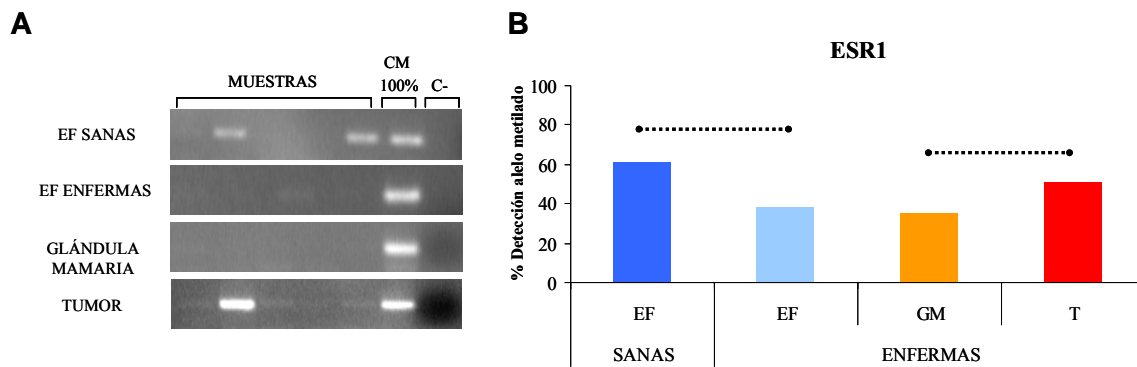


Figura 36. Determinación cualitativa de la metilación del gen ESR1 por "MSP" en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen ESR1 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Gen PRB

Los valores obtenidos de frecuencia de metilación en sangre periférica no mostraron diferencias significativas entre ambas poblaciones, pese a que dichos valores fueron inferiores en las enfermas (60,24%) en comparación con las voluntarias sanas (73,02%). Por otro lado, se detectó un incremento significativo en el número de muestras con alelo metilado en tumor (51,69%) respecto a glándula mamaria (28,09%). Al comparar entre sangre periférica y tejido mamario, se observó una disminución significativa en la frecuencia de metilación en glándula mamaria en relación a los elementos formes de las pacientes (Figura 37).

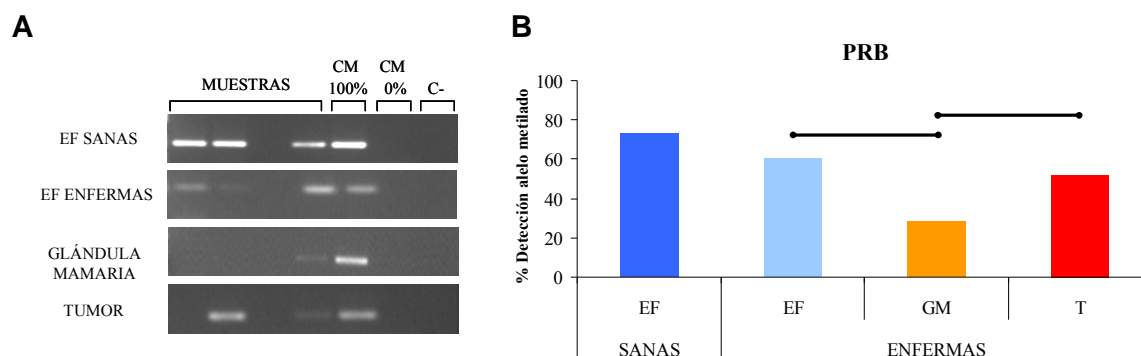


Figura 37. Determinación cualitativa de la metilación del gen PRB por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen PRB en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Gen RASSF1A

En sangre periférica de las voluntarias sanas no se detectó ninguna muestra con alelo metilado para el gen RASSF1A. Sin embargo, en el caso de los elementos formes de las enfermas, el 6,02% de las muestras analizadas presentaron dicho alelo. Además este incremento en la frecuencia de metilación entre elementos formes de ambas poblaciones fue estadísticamente significativo. A su vez, la detección de metilación en tumor (79,78%) fue significativamente superior a la obtenida en glándula mamaria (40,45%). La comparación entre tejidos de las pacientes mostró un incremento significativo y progresivo en la frecuencia de metilación del gen RASSF1A en elementos formes, glándula mamaria y tumor (Figura 38).

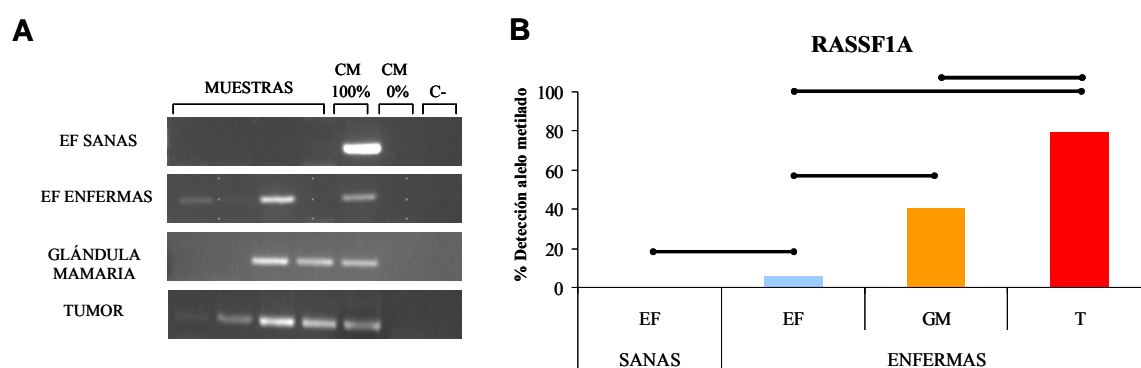


Figura 38. Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen RASSF1A en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2.3. Gen implicado en insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento: NES1

En el caso del gen NES1, no se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia de metilación detectada en elementos formes entre las voluntarias sanas (58,73%) y las enfermas de cáncer de mama (63,86%). Por otro lado, se observó un incremento significativo en la detección del alelo metilado en tumor (68,54%) respecto a glándula mamaria (41,57%). Al comparar entre sangre periférica y tejido mamario se observó una disminución significativa en la frecuencia de metilación entre la glándula mamaria y los elementos formes de las pacientes (Figura 39).

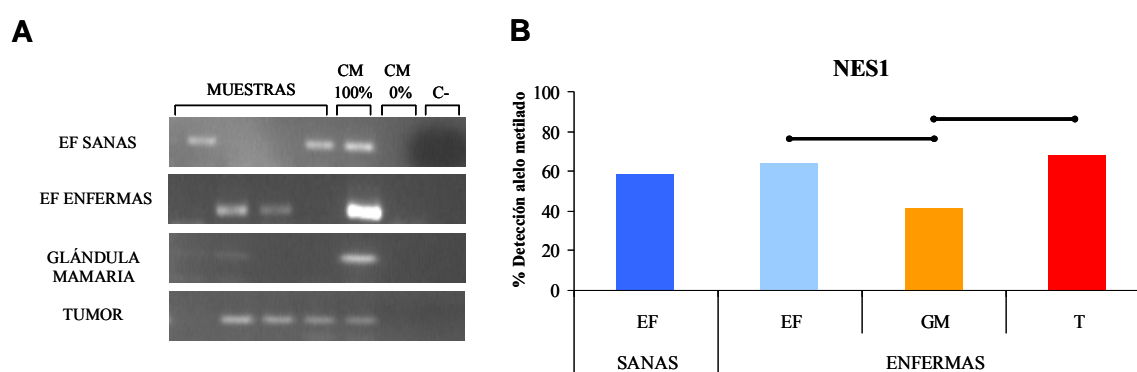


Figura 39. Determinación cualitativa de la metilación del gen NES1 por "MSP" en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen NES1 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2.4. Gen implicado en evasión de la apoptosis: TWIST1

En sangre periférica, no se detectó ninguna muestra con alelo metilado para el gen TWIST1 en la población de voluntarias sanas, mientras que únicamente el 1,20% de las muestras de elementos formes de enfermas presentaron dicho alelo. En tejido mamario, se observó un aumento significativo de la frecuencia de metilación en tumor (32,58%) respecto a glándula mamaria (5,62%). Además, la comparación entre sangre periférica y tejido mamario mostró un incremento progresivo en la frecuencia de metilación del gen TWIST1 en elementos formes, glándula mamaria y tumor de las enfermas, siendo las diferencias halladas entre elementos formes y tejido tumoral estadísticamente significativas (Figura 40).

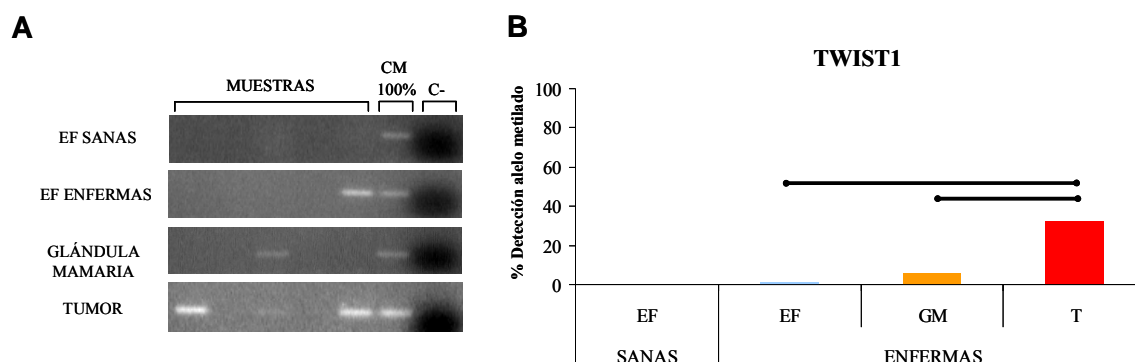


Figura 40. Determinación cualitativa de la metilación del gen TWIST1 por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen TWIST1 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2.5. Gen implicado en inducción de la angiogénesis: MASPINA

Las frecuencias de metilación obtenidas para el gen MASPINA fueron muy elevadas tanto en sangre periférica de ambas poblaciones, como en glándula mamaria y tumor de las enfermas. Así, no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de detección de metilación en elementos formes de sanas (93,65%) y de enfermas (92,77%). Tampoco se hallaron diferencias significativas entre glándula mamaria (77,27%) y tumor (84,27%). Sin embargo, al realizar la comparación entre tejidos en enfermas, se obtuvo un descenso significativo en la frecuencia de metilación en glándula mamaria y cercano a la significación en tumor, en comparación con los elementos formes (Figura 41).

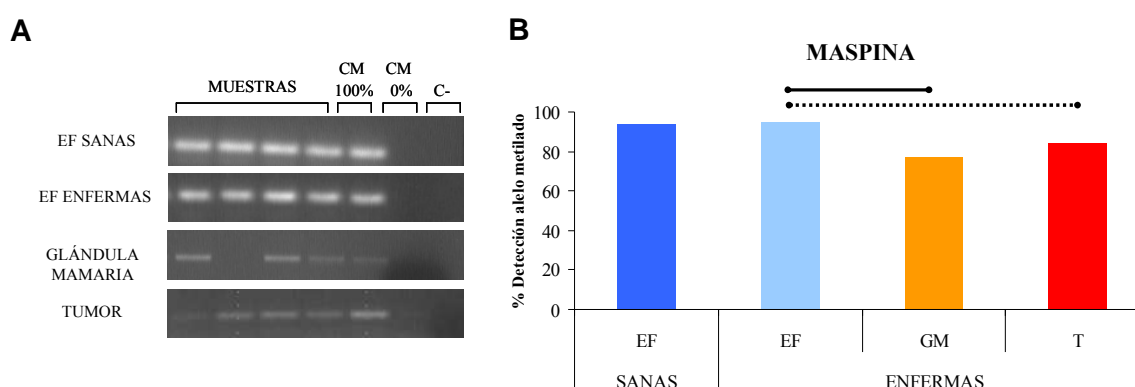


Figura 41. Determinación cualitativa de la metilación del gen MASPINA por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen MASPINA en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

3.2.6. Genes implicados en activación de la invasión y metástasis: CXCL12 y CDH1

Gen CXCL12

El número de muestras que presentaron alelo metilado para el gen CXCL12 fue muy reducido, tanto en elementos formes de las voluntarias sanas (4,76%), como en elementos formes (3,61%), glándula mamaria (3,37%) y tumor (6,74%) de las enfermas. Así, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas, ni entre poblaciones ni entre tejidos (Figura 42).

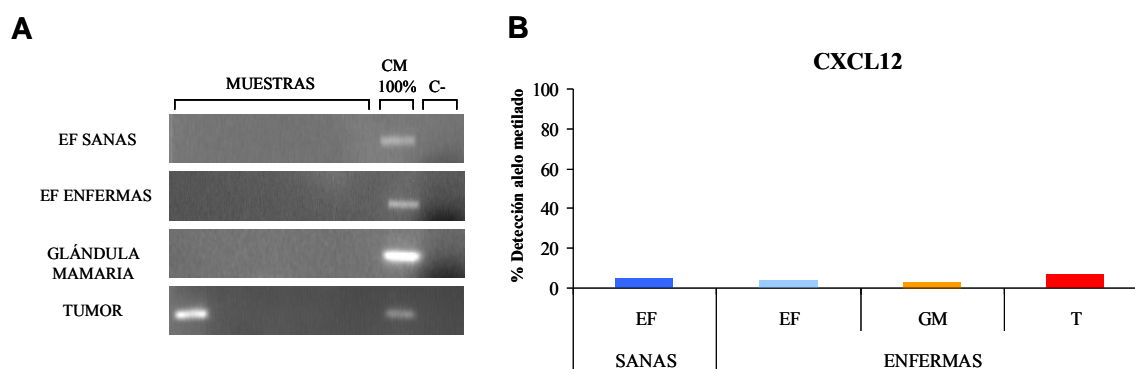


Figura 42. Determinación cualitativa de la metilación del gen CXCL12 por "MSP" en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen CXCL12 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, C-: control negativo.

Gen CDH1

En cuanto al gen CDH1, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de metilación en elementos formes entre las voluntarias sanas (53,97%) y las enfermas (61,45%). En tejido mamario, se observó un incremento significativo en la detección del alelo metilado en tumor (55,06%) respecto a glándula mamaria (29,21%). Además, las frecuencias obtenidas en glándula mamaria fueron significativamente inferiores a las halladas en los elementos formes de las enfermas (Figura 43).

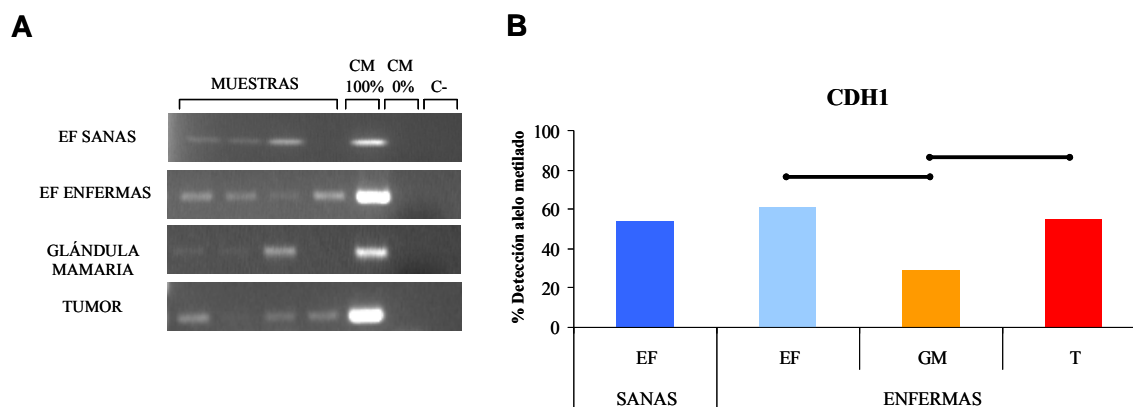


Figura 43. Determinación cualitativa de la metilación del gen CDH1 por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen CDH1 en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2.7. Gen implicado en evasión del sistema inmune: HLA-A

Los resultados obtenidos para el gen HLA-A no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de metilación en elementos formes entre ambas poblaciones (3,17% en sanas y 7,23% en enfermas). Por otro lado, se observó un aumento significativo del porcentaje de detección del alelo metilado en tumor (20,22%) respecto a glándula mamaria (4,49%). La comparación entre tejidos de las pacientes mostró un incremento significativo en la frecuencia de metilación en tumor en relación a los elementos formes (Figura 44).

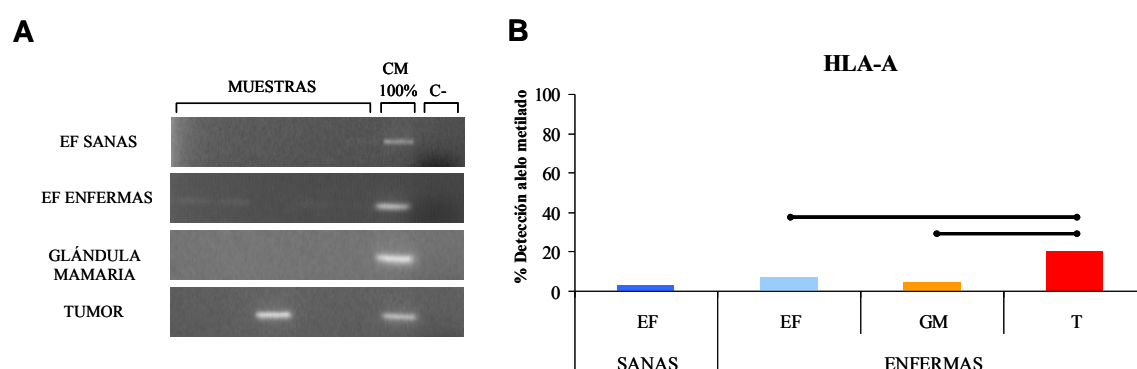


Figura 44. Determinación cualitativa de la metilación del gen HLA-A por “MSP” en los distintos tejidos. Imagen representativa de la detección del alelo metilado (A) y porcentaje de detección de dicho alelo (B) del gen HLA-A en muestras humanas. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, CM 100%: ADN control 100% metilado, C-: control negativo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.3. Determinación cuantitativa de la metilación gen-específica

Se amplió el estudio del estado de metilación de los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A mediante técnicas cuantitativas.

Gen BRCA1

El análisis de la metilación de forma cuantitativa se realizó por amplificación por PCR y posterior pirosecuenciación (Figura 45).

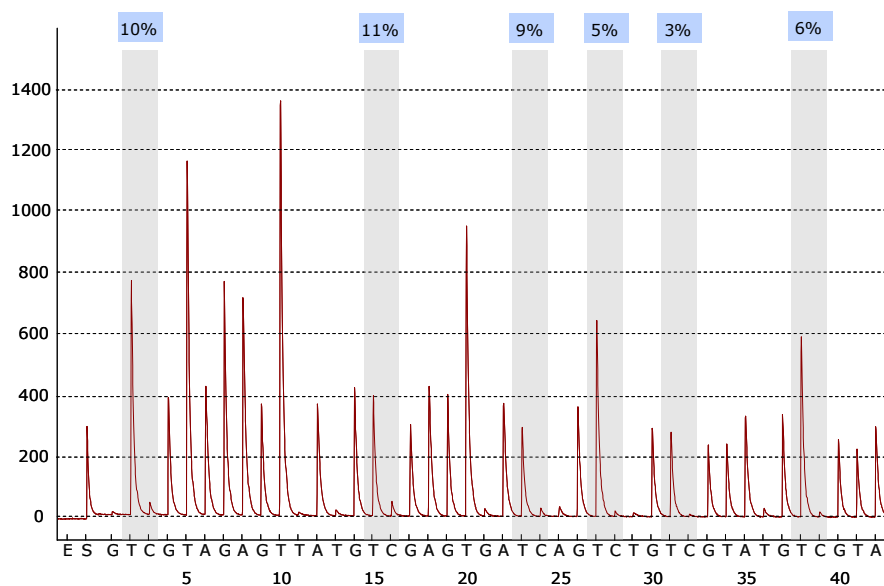


Figura 45. Pirograma representativo de la determinación cuantitativa de la metilación del gen BRCA1 en las muestras humanas. Enmarcado en color azul se indica el grado de metilación (%) de cada una de las posiciones CpG analizadas.

En sangre periférica se observó un incremento en la metilación del gen BRCA1 en las pacientes con cáncer de mama respecto a las voluntarias sanas. Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas en los valores obtenidos entre glándula mamaria y tumor (Figura 46).

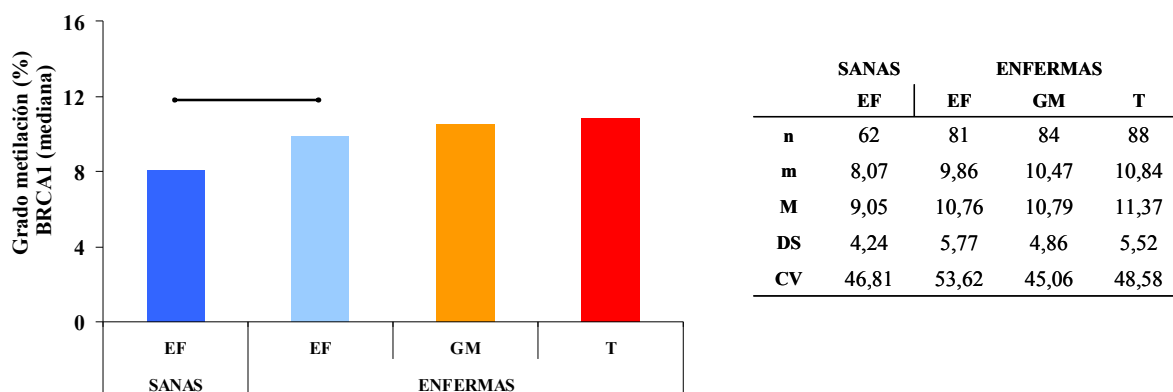


Figura 46. Grado de metilación del gen BRCA1 en los distintos tejidos. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Gen ESR1

En primer lugar se realizó la determinación de la metilación de forma semi-cuantitativa mediante la técnica “COBRA” (“COmbined Bisulfite Restriction Assay”). En la Figura 47 se muestra una imagen representativa de las bandas obtenidas para el gen ESR1 en este ensayo.

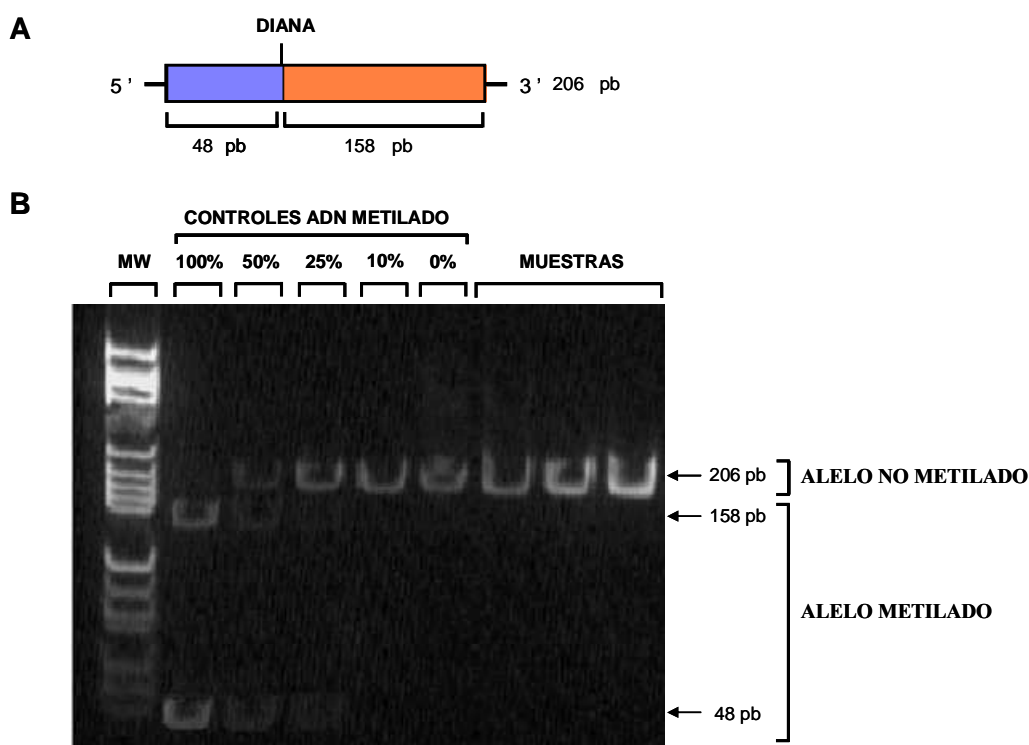
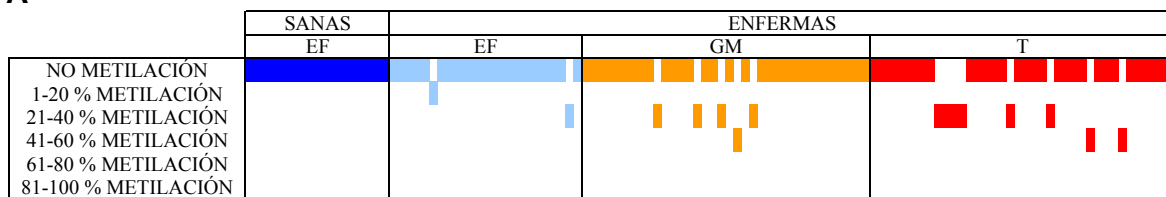


Figura 47. Análisis “COBRA” para la determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen ESR1 en las muestras humanas. (A) Esquema del fragmento amplificado por PCR donde se indica la diana de restricción de *BstUI* (CG[^]CG) y el tamaño de los fragmentos digeridos. (B) Imagen representativa de la detección de los fragmentos amplificados y digeridos. pb: pares de bases, MW: marcador de peso molecular, controles ADN metilado: controles de ADN con distinto porcentaje de metilación (100%, 50%, 25%, 10%, 0%).

Tal y como se muestra en la Figura 48, todas las muestras de elementos formes de las voluntarias sanas presentaron el alelo no metilado, mientras que en las enfermas la frecuencia de metilación en elementos formes fue del 8% (2/25). En tejido mamario, se detectó metilación en el 13,88% (5/36) de las muestras de glándula mamaria y en el 21,05% (8/38) de las muestras de tumor. No se observaron diferencias significativas entre tejidos ni entre las dos poblaciones, ni en la frecuencia de muestras con alelo metilado ni en el grado de metilación del gen ESR1 (datos no graficados dado que la mediana fue cero en todos los tejidos).

A



B

	SANAS	ENFERMAS		
	EF	EF	GM	T
n	18	25	36	38
m	0,00	0,00	0,00	0,00
M	0,00	1,86	5,10	7,32
DS	0,00	6,55	12,92	14,69
CV	NA	352,78	253,52	200,72

Figura 48. Determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen ESR1 por “COBRA” en los distintos tejidos. (A) Distribución de la detección del alelo metilado del gen ESR1 por rangos de metilación. (B) Grado de metilación (%) del gen ESR1. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%).

Por otro lado, tal y como se ha comentado previamente, el estudio de la metilación del gen ESR1 en las muestras humanas se realizó también de forma cuantitativa por pirosecuenciación (Figura 49).

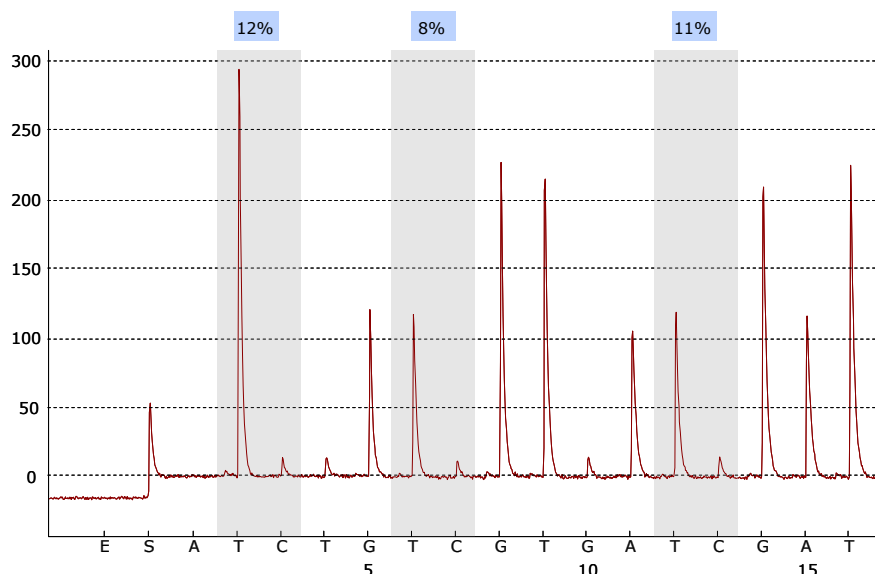


Figura 49. Piograma representativo de la determinación cuantitativa de la metilación del gen ESR1 en las muestras humanas. Enmarcado en color azul se indica el grado de metilación (%) de cada una de las posiciones CpG analizadas.

En este sentido, en sangre periférica se observó un incremento significativo de la metilación del gen ESR1 en las enfermas de cáncer de mama respecto a las voluntarias sanas. Por otro lado, no se hallaron diferencias estadísticamente relevantes entre glándula mamaria y tumor (Figura 50).

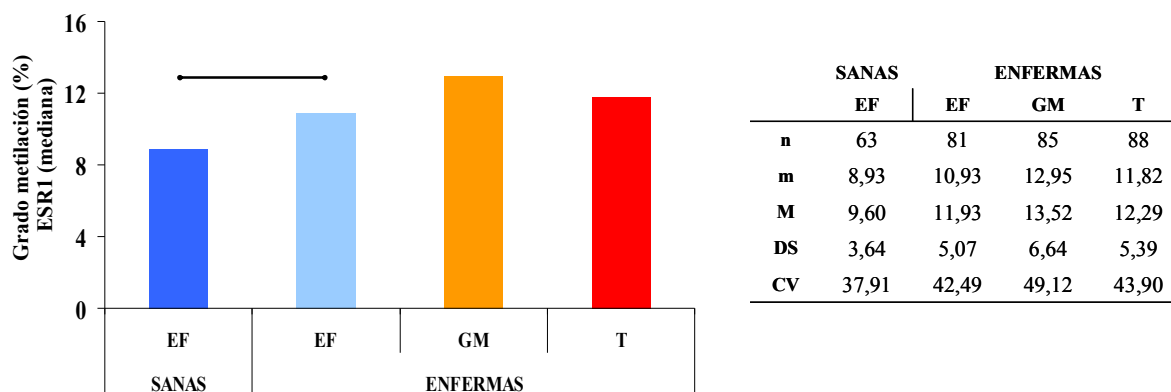


Figura 50. Grado de metilación del gen ESR1 en los distintos tejidos. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Gen RASSF1A

La ampliación del estudio de RASSF1A también se realizó, en primera instancia, mediante un análisis semi-cuantitativo (“COBRA”) y, posteriormente, de forma cuantitativa por pirosecuenciación.

En la Figura 51 se muestra una imagen representativa de las bandas obtenidas en el ensayo “COBRA” para el gen RASSF1A.

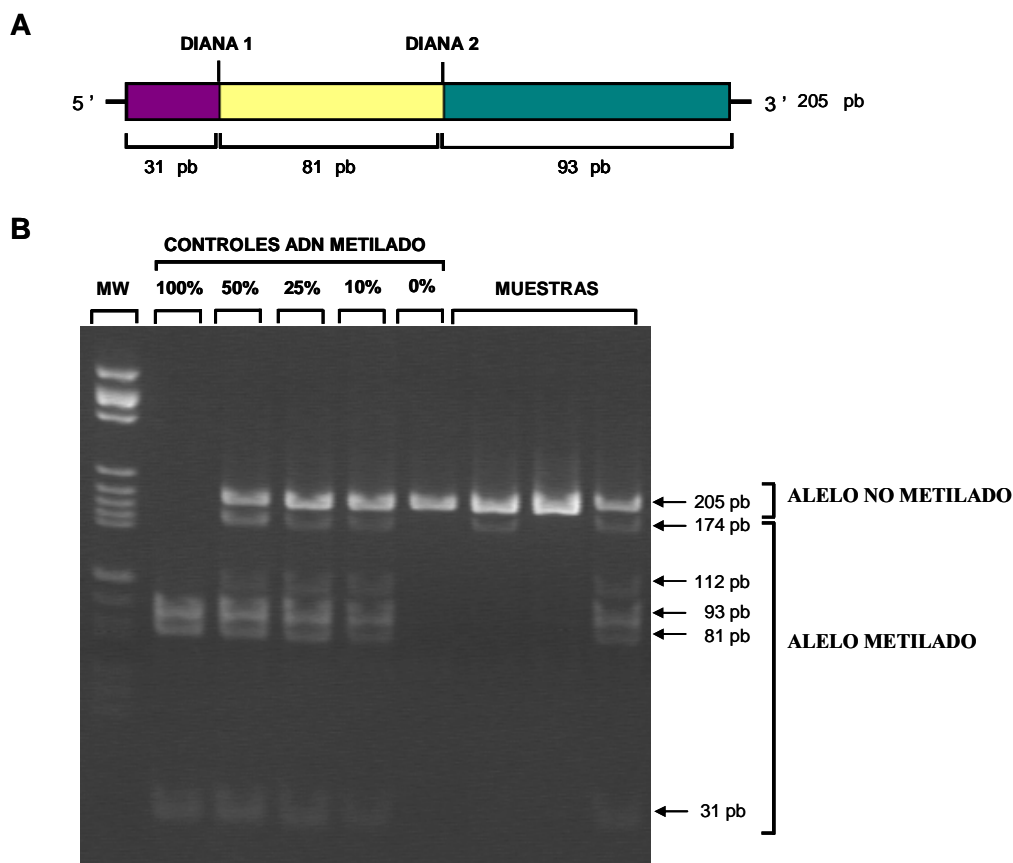


Figura 51. Análisis “COBRA” para la determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A en las muestras humanas. (A) Esquema del fragmento amplificado por PCR donde se indican las dianas de restricción de *TaqI* (T[^]CGA) y el tamaño de los fragmentos digeridos. **(B)** Imagen representativa de la detección de los fragmentos amplificados y digeridos. pb: pares de bases, MW: marcador de peso molecular, controles ADN metilado: controles de ADN con distinto porcentaje de metilación (100%, 50%, 25%, 10%, 0%).

En sangre periférica no se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia de metilación del gen RASSF1A entre las voluntarias sanas (7/18; 38,88%) y las enfermas de cáncer de mama (25/55; 45,45%). En tejido mamario, la frecuencia de metilación fue del 77,19% (44/57) en glándula mamaria y del 92,98% (53/57) en tumor. Además de este aumento en la cantidad de tumores con alelo metilado, el grado de metilación del gen RASSF1A fue significativamente superior en tejido tumoral en relación a la glándula

mamaria, así como el de ambos tejidos mamarios respecto a elementos formes de la población de enfermas. Sin embargo, en elementos formes no se hallaron diferencias en el grado de metilación del gen RASSF1A entre las dos poblaciones (Figura 52).

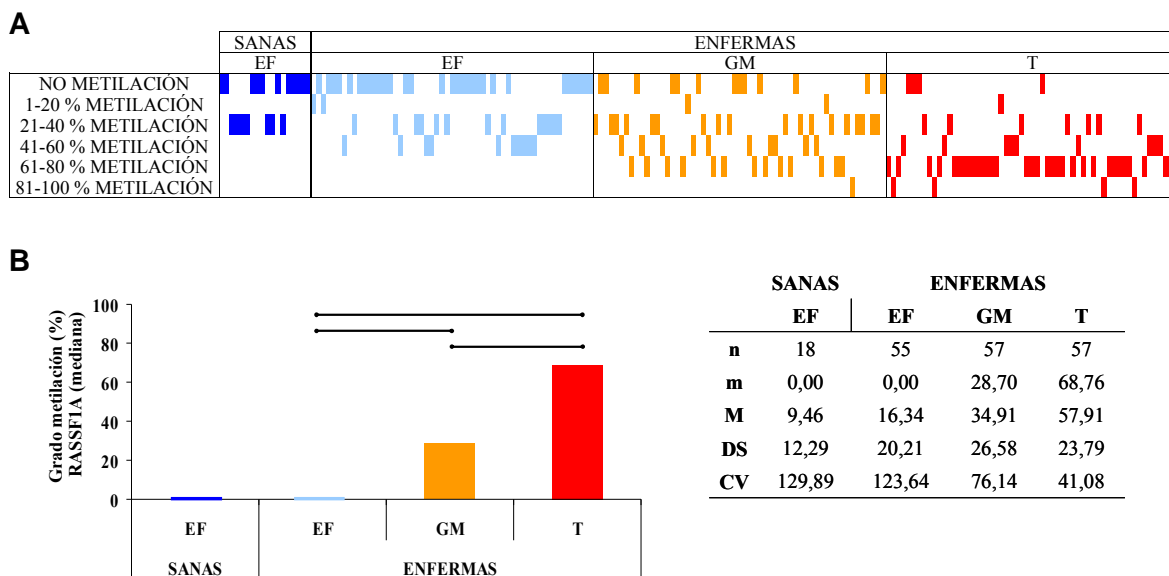


Figura 52. Determinación semi-cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A por “COBRA” en los distintos tejidos. (A) Distribución de la detección del alelo metilado del gen RASSF1A por rangos de metilación. (B) Grado de metilación (%) del gen RASSF1A. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%).

Por otro lado, la determinación del grado de metilación del gen RASSF1A en las muestras humanas también se realizó de forma cuantitativa por pirosecuenciación (Figura 53).

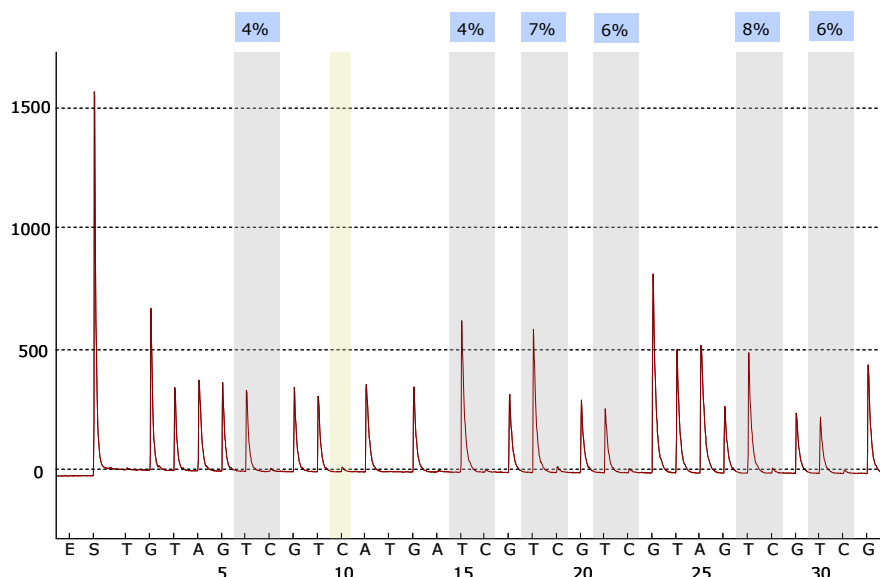


Figura 53. Pirograma representativo de la determinación cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A en las muestras humanas. Enmarcado en color azul se indica el grado de metilación (%) de cada una de las posiciones CpG analizadas.

En sangre periférica no se hallaron diferencias con relevancia estadística en el grado de metilación del gen RASSF1A entre sanas y enfermas. Por otro lado, se detectó un incremento significativo de la metilación de dicho gen en tumor respecto a glándula mamaria. En cuanto a la comparación entre tejidos en las enfermas, se observó un aumento de la metilación en glándula mamaria y tumor en relación a los elementos formes (Figura 54).

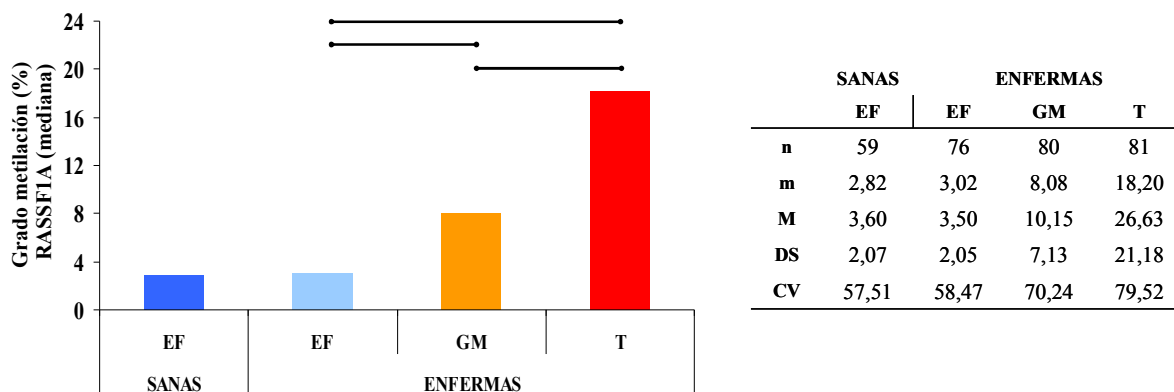


Figura 54. Grado de metilación del gen RASSF1A en los distintos tejidos. EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y DE ESTILO DE VIDA SOBRE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÁNCER DE MAMA HUMANO

4.1 Influencia de los parámetros clínicos sobre la metilación del ADN

Los parámetros de historia reproductiva seleccionados para el presente trabajo han sido relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama ([3950], [3966], [5975], [6093]). En este sentido, con el fin de evaluar la implicación de la metilación del ADN como posible mecanismo a través del cual dichos parámetros podrían estar ejerciendo tales acciones, se realizaron correlaciones (Tabla 16) y pruebas estadísticas de asociación (Tabla 17) entre los datos reproductivos y los obtenidos a nivel molecular.

En cuanto a la **edad**, se observó una correlación positiva con el grado de metilación global en elementos formes de voluntarias sanas. Los resultados a nivel gen-específico mostraron asociaciones positivas entre la edad y la metilación del gen ESR1 en sangre periférica de sanas así como en glándula mamaria de enfermas. Además, la metilación del gen RASSF1A

en tejido mamario sano y tumoral también correlacionó positivamente con la edad de las pacientes.

La **edad de aparición de la menarquia** no mostró asociaciones con relevancia estadística ni con el grado de metilación global del ADN ni con la metilación a nivel gen-específico de BRCA1, ESR1 y RASSF1A.

Respecto a la **edad de aparición de la menopausia**, ésta correlacionó positivamente con la metilación del gen BRCA1 en elementos formes de mujeres sanas y glándula mamaria de enfermas, y con la metilación del gen ESR1 en sangre periférica de enfermas.

Por otro lado, el **número de embarazos** en las pacientes con cáncer de mama correlacionó de forma positiva con la metilación génica de BRCA1 en sangre periférica, y de forma negativa en glándula mamaria. En las voluntarias sanas se detectó una asociación positiva entre el número de gestaciones y la metilación del gen ESR1 en elementos formes.

La **edad en la primera gestación** correlacionó negativamente con el grado de metilación global del ADN en sangre periférica de sanas, mientras que en enfermas se asoció a una mayor metilación genómica en glándula mamaria y tumor. Los resultados a nivel gen-específico mostraron correlaciones positivas entre dicho parámetro y la metilación de los genes BRCA1 (en elementos formes y tumor de enfermas) y ESR1 (en tejido mamario sano y tumoral). En el caso del gen RASSF1A, se halló una correlación negativa entre la edad en la primera gestación y la metilación de dicho supresor tumoral en sangre periférica de mujeres sanas.

En relación a los parámetros antropométricos, el **índice de masa corporal (IMC)** se asoció negativamente con la metilación génica de RASSF1A en glándula mamaria y tumor, mientras que la **ratio cintura-cadera** se halló inversamente asociada a la metilación de dicho gen en sangre periférica de enfermas.

Por lo que respecta a las variables categóricas (Tabla 17), se observó asociaciones significativas entre el **estado ovárico** y la metilación del gen RASSF1A en glándula mamaria. En este sentido, las enfermas premenopáusicas mostraron significativamente un menor grado de metilación de RASSF1A en glándula mamaria en relación a las perimenopáusicas y postmenopáusicas. Por otro lado, la práctica de **lactancia materna** se asoció de forma significativa a una mayor metilación génica de RASSF1A en tejido tumoral.

	MET. GLOBAL						BRCA1						ESR1						RASSF1A					
	SANAS			ENFERMAS			SANAS			ENFERMAS			SANAS			ENFERMAS			SANAS			ENFERMAS		
	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T			
EDAD	rho	0,272	-0,016	0,143	0,054	0,143	0,072	0,160	0,143	0,375	0,161	0,191	0,082	0,174	-0,181	0,241	0,266							
	n	43	75	71	75	79	74	75	79	45	75	76	79	45	71	72	73							
	p-value	0,077*	0,890	0,235	0,648	0,207	0,544	0,169	0,207	0,011**	0,167	0,098*	0,469	0,251	0,129	0,041**	0,023**							
EDAD MENARQUIA	rho	-0,097	-0,123	0,014	-0,0006	0,033	-0,024	0,066	0,033	-0,016	0,034	0,008	0,032	-0,236	-0,088	0,116	0,124							
	n	46	74	70	74	78	73	74	78	48	74	75	78	48	70	71	72							
	p-value	0,519	0,294	0,910	0,996	0,770	0,841	0,575	0,770	0,911	0,773	0,946	0,777	0,105	0,465	0,336	0,299							
EDAD MENOPAUSIA	rho	0,142	0,128	0,103	-0,097	0,186	0,115	0,308	0,186	0,172	0,28	0,204	-0,041	0,139	-0,151	0,176	0,246							
	n	16	45	41	45	46	44	44	46	16	45	44	47	16	41	42	43							
	p-value	0,599	0,402	0,521	0,523	0,214	0,455	0,042**	0,214	0,525	0,062*	0,184	0,782	0,607	0,346	0,263	0,112							
NÚMERO EMBARAZOS	rho	-0,033	-0,077	0,007	0,059	-0,034	0,215	-0,244	-0,034	0,261	0,083	-0,036	-0,0006	0,197	0,178	-0,087	0,055							
	n	47	76	72	75	80	75	76	80	49	76	77	80	49	72	73	74							
	p-value	0,823	0,509	0,952	0,609	0,765	0,063*	0,033**	0,765	0,395	0,071*	0,472	0,995	0,173	0,134	0,461	0,638							
EDAD PRIMERA GESTACIÓN	rho	-0,377	0,049	0,334	0,412	0,478	0,312	0,198	0,478	-0,158	0,237	0,404	0,371	-0,326	0,233	0,187	-0,169							
	n	31	35	33	37	38	34	34	38	32	35	35	37	32	35	34	35							
	p-value	0,036**	0,777	0,057*	0,011**	0,002**	0,473*	0,260	0,002**	0,414	0,169	0,016**	0,024**	0,068*	0,177	0,289	0,330							
IMC	rho	-0,154	0,096	-0,022	0,061	-0,185	0,029	0,148	-0,185	0,034	0,123	0,197	-0,057	-0,232	-0,023	-0,359	-0,33							
	n	24	53	52	54	57	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54							
	p-value	0,470	0,491	0,875	0,660	0,168	0,835	0,284	0,168	0,549	0,374	0,148	0,669	0,275	0,869	0,009**	0,014**							
RATIO CINTURA-CADERA	rho	-0,082	-0,007	-0,132	-0,090	-0,009	-0,029	0,059	-0,009	0,102	0,079	0,093	-0,097	0,216	-0,265	0,078	-0,048							
	n	24	53	52	54	57	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54							
	p-value	0,704	0,957	0,350	0,516	0,946	0,832	0,670	0,946	0,302	0,565	0,497	0,471	0,309	0,062*	0,585	0,726							

Tabla 16. Correlación entre parámetros reproductivos de los individuos y datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pirosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pirosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pirosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, IMC: índice de masa corporal, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

	MET. GLOBAL			BRCA1			ESR1			RASSF1A			
	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	
ESTADO OVÁRICO	n	30	25	26	32	25	27	32	25	27	26	25	
	m	83,25	85,11	82,46	81,15	7,20	9,65	9,87	10,72	13,32	11,48	12,46	
	n	1	7	6	7	1	8	8	7	7	8	7	
	m	84,79	84,11	82,16	82,11	7,91	8,44	11,85	9,60	9,46	10,17	11,47	
	n	16	41	38	41	16	40	42	16	41	40	43	
	m	85,32	84,31	83,42	82,30	7,63	9,80	10,63	9,23	11,10	13,73	12,37	
<i>p-value</i>	0,422	0,853	0,434	0,626	0,906	0,567	0,393	0,117	0,118	0,292	0,739	0,035**	
LACTANCIA MATERNA	n	29	36	32	36	30	35	38	36	34	38	36	
	m	83,27	84,42	83,53	82,15	6,62	9,86	10,36	11,17	10,30	13,15	12,83	
	n	16	33	33	33	17	34	34	17	34	36	35	
	m	83,54	84,19	82,46	82,04	7,47	7,79	9,72	7,33	10,52	13,57	11,23	
	<i>p-value</i>	0,868	0,665	0,149	0,938	0,528	0,623	0,754	0,150	0,638	0,823	0,377	0,035**

Tabla 17. Asociación entre parámetros reproductivos de los individuos y datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pírosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pírosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pírosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, *p-value*: significación estadística). En azul se destacan las asociaciones con relevancia estadística (**: $p < 0,05$).

Paralelamente, tras seleccionar una serie de parámetros histopatológicos tumorales, se realizaron pruebas estadísticas de asociación entre dichos parámetros y los datos obtenidos en el estudio molecular en la población de enfermas (Tabla 18).

En cuanto al **grado tumoral**, se observó una asociación con el nivel de metilación global del ADN en sangre periférica. Así, los individuos con tumores de grado I presentaron mayores niveles de metilación genómica en elementos formes respecto a los individuos con tumores de grado II ($p < 0,05$) y III ($0,05 < p < 0,1$). El grado tumoral también se asoció con el nivel de metilación génica de BRCA1 en glándula mamaria y tumor, siendo significativamente mayor en glándula mamaria de individuos con tumores de grado I en relación a los de grado II, mientras que en tejido tumoral se observó una mayor metilación de BRCA1 en los individuos con tumores de grado I ($p < 0,05$) y II ($0,05 < p < 0,1$) respecto a los de grado III.

En relación al **estadio tumoral**, se halló una asociación con el grado de metilación del ADN a nivel global. De tal forma que los tumores de estadio IB presentaron un menor grado de metilación genómica en comparación con los tumores de estadios IIB y IIIB ($p < 0,05$) y IIA y IIIA ($0,05 < p < 0,1$). Además, en tumores de estadio IIA se detectaron menores niveles de metilación global del ADN, de forma cercana a la significación, que en tumores de estadio IIB. Por otro lado, el estadio tumoral también se halló asociado al grado de metilación génica de ESR1 en tejido tumoral. Así, los niveles de metilación de ESR1 en tumores de estadio IB fueron significativamente inferiores a los detectados en tumores de estadios IIA, IIB, IIIA y IIIB, y de forma cercana a la significación, respecto a los tumores de estadio IIIC.

Por lo que respecta al estatus del **receptor de estrógenos (RE)**, se detectó una asociación significativa con la metilación global en glándula mamaria, y con la metilación génica de BRCA1 y ESR1 en elementos formes, glándula mamaria y tumor. En este sentido, los individuos cuyos tumores presentaron baja expresión de RE (+) mostraron, de forma significativa, menores niveles de metilación genómica y gen-específica en dichos tejidos en relación al resto de categorías. Además, se halló una asociación entre el estatus del RE y la metilación del gen RASSF1A en glándula mamaria y tumor. Así, los individuos que presentaron una expresión de RE media (++) en tejido tumoral presentaron significativamente menor metilación génica de RASSF1A en glándula mamaria en relación a los de expresión nula (-) y alta (+++). Por otro lado, los tumores cuya expresión de RE fue nula mostraron significativamente un menor grado de metilación de RASSF1A que los tumores de expresión alta.

En relación al estatus del **receptor de progesterona (RP)**, se detectó una asociación con el grado de metilación global en glándula mamaria y con la metilación de BRCA1 en glándula mamaria y tumor. Así, los individuos con baja expresión tumoral de RP (+) presentaron significativamente menor metilación global en glándula mamaria y metilación de BRCA1 en glándula mamaria y tumor que los individuos con expresión de RP nula (-) y alta (+++).

Por último, la **clasificación molecular** de los tumores se asoció con el grado de metilación del gen RASSF1A en sangre periférica. En este sentido, las pacientes cuyos tumores pertenecían al subtipo luminal A presentaron significativamente menores niveles de metilación de RASSF1A en elementos formes en relación a los individuos con tumores luminal B HER2⁺ y triple negativo indeterminado, y de forma cercana a la significación respecto al subtipo basal. Además, los individuos con tumores luminal B HER2⁻ presentaron menor grado de metilación de RASSF1A en sangre periférica que los individuos con tumores triple negativo indeterminado ($0,05 < p < 0,1$).

RESULTADOS

		MET. GLOBAL			BRCA1			ESR1			RASSF1A		
		EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T
GRADO TUMORAL													
I	n	8	7	7	7	8	8	7	7	8	6	7	7
	m	86,44	81,82	82,20	11,05	13,67	12,80	11,09	11,56	12,16	4,14	8,73	19,28
II	n	41	40	42	41	42	45	42	44	45	39	43	42
	m	84,30	82,74	82,10	9,61	9,19	11,11	10,31	12,82	12,70	2,8	7,85	19,15
III	n	18	17	18	18	18	18	18	18	18	18	17	16
	m	84,39	83,31	81,15	11,24	9,91	8,92	11,61	13,17	10,47	3,4	6,78	9,84
	<i>p-value</i>	0,082*	0,399	0,963	0,611	0,085*	0,084*	0,740	0,948	0,301	0,484	0,645	0,116
ESTADIO TUMORAL													
IA	n	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1
	m	NA	82,81	74,40	NA	NA	8,14	NA	16,77	NA	NA	16,05	46,93
IB	n	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3
	m	83,85	80,00	77,81	7,35	5,28	4,73	9,81	8,71	5,73	3,43	12,64	44,03
IIA	n	17	15	17	15	17	17	16	16	17	14	17	13
	m	83,32	83,31	80,60	12,02	8,61	11,63	10,57	11,45	12,75	3,14	8,73	13,98
IIB	n	17	17	18	18	18	18	18	18	18	17	18	18
	m	84,36	82,68	83,09	9,74	11,06	11,32	10,91	13,17	12,36	2,54	8,85	12,28
IIIA	n	21	17	17	21	19	20	21	19	21	20	16	20
	m	84,19	83,37	82,24	7,98	10,80	10,87	9,46	12,64	11,83	3,42	7,22	14,45
IIIB	n	12	11	11	12	11	12	12	11	12	12	10	10
	m	84,63	82,98	81,82	9,34	11,89	10,78	11,28	13,32	11,19	3,10	7,02	43,4
IIIC	n	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4	3	4
	m	83,65	84,84	83,92	8,30	10,04	10,80	12,32	21,91	16,07	2,47	4,73	10,62
IV	n	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3
	m	86,71	82,90	82,20	10,75	11,29	11,27	10,33	10,04	7,68	4,37	7,95	19,28
	<i>p-value</i>	0,415	0,233	0,090*	0,640	0,222	0,265	0,635	0,137	0,065*	0,952	0,289	0,314
RECEPTOR ESTRÓGENOS													
-	n	16	15	13	16	16	16	16	16	16	15	15	13
	m	84,31	83,48	81,19	12,96	10,42	10,76	12,83	12,21	11,54	4,26	8,97	10,71
+	n	10	11	12	10	12	12	10	11	12	9	11	12
	m	84,21	80,69	80,60	5,88	6,66	5,55	7,41	8,71	7,35	2,32	8,22	15,15
++	n	8	9	8	8	8	8	8	9	8	7	9	9
	m	84,49	82,81	82,06	9,98	12,03	12,21	12,50	15,10	15,02	2,54	4,14	20,11
+++	n	40	36	41	39	38	42	40	39	42	39	36	38
	m	84,39	83,64	82,21	9,61	10,60	11,09	10,58	13,37	12,67	2,92	7,94	24,57
	<i>p-value</i>	0,799	0,013**	0,552	0,047**	0,075*	0,023**	0,066*	0,062*	0,018**	0,689	0,091*	0,080*
RECEPTOR PROGESTERONA													
-	n	19	17	17	19	18	19	19	18	19	17	17	17
	m	84,07	83,31	80,72	11,09	10,70	12,57	11,10	13,92	11,47	4,26	8,97	12,44
+	n	9	11	10	9	11	11	9	11	11	8	11	10
	m	84,36	80,59	80,18	10,25	6,74	5,60	11,51	10,01	7,70	2,66	8,22	11,46
++	n	11	12	12	12	12	12	12	13	12	12	13	13
	m	84,19	82,47	82,15	6,87	8,42	7,85	9,64	11,74	8,90	2,44	7,89	12,50
+++	n	35	31	35	33	33	36	34	33	36	33	30	32
	m	84,62	83,74	82,46	9,61	11,29	11,19	10,88	13,38	12,86	3,45	7,81	24,57
	<i>p-value</i>	0,576	0,086*	0,225	0,683	0,048**	0,004**	0,714	0,251	0,158	0,679	0,828	0,272
CLASIFICACIÓN MOLECULAR													
Luminal A	n	17	17	18	15	18	19	16	17	19	14	17	16
	m	84,11	82,81	80,64	7,99	10,64	12,77	9,48	16,34	11,46	2,26	7,92	27,14
Luminal B HER2 -	n	30	28	32	31	30	32	31	31	32	31	29	32
	m	84,42	82,48	82,15	7,98	10,61	10,85	10,72	12,67	12,73	2,80	7,89	17,22
Luminal B HER2 +	n	9	9	8	9	9	9	9	9	9	9	8	8
	m	86,10	84,43	82,76	11,74	9,68	10,60	12,47	13,32	13,18	4,51	6,11	14,19
HER2+	n	7	6	5	7	7	7	7	7	7	7	7	6
	m	84,57	82,75	84,58	9,86	10,04	10,81	9,97	10,17	11,47	3,92	11,14	17,70
Basal	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	5	5
	m	85,17	80,13	80,53	14,15	9,65	11,41	14,55	12,95	11,62	4,30	6,18	8,13
Triple negativo indeterminado	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
	m	86,44	84,01	82,30	13,90	12,51	8,92	14,99	15,55	11,13	5,90	13,51	11,58
	<i>p-value</i>	0,636	0,130	0,537	0,318	0,942	0,538	0,357	0,499	0,85	0,082*	0,322	0,141

Tabla 18. Asociación entre parámetros histopatológicos tumorales y datos moleculares de los distintos tejidos de las enfermas de cáncer de mama. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pírosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pírosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pírosecuenciación-, EF: elementos formes de enfermas, GM: glándula mamaria, T: tumor, Triple negativo indeterminado: subgrupo sin datos sobre el estatus de las citoqueratinas 5 y 6, n: tamaño muestral, m: mediana, *p-value*: significación estadística). En azul se destacan las asociaciones con relevancia estadística, donde ** indica asociaciones significativas ($p < 0,05$) y * corresponde a asociaciones cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

4.2 Influencia del estilo de vida sobre la metilación del ADN

Diversos factores tanto nutricionales como de estilo de vida han sido asociados a alteraciones a nivel epigenético en cáncer, evidenciando el carácter reversible de tales aberraciones. Por este motivo, se consideró de interés evaluar la influencia de los hábitos dietéticos y de estilo de vida caracterizados a través de los cuestionarios (de frecuencia de consumo de alimentos, de adherencia a la Dieta Mediterránea y de actividad física) sobre los patrones de metilación del ADN (Tablas 19 y 20).

En relación al **hábito tabáquico**, no se hallaron asociaciones significativas con el grado de metilación global del ADN ni con la metilación génica de BRCA1, ESR1 y RASSF1A.

Por lo que respecta al **consumo de alcohol**, se observó una correlación positiva con los niveles de metilación genómica del ADN en sangre periférica de voluntarias sanas. En cuanto a la metilación a nivel gen-específico, la ingesta diaria de alcohol correlacionó positivamente con el grado de metilación génica de BRCA1 y ESR1 en tejido tumoral.

Por otro lado, la **actividad física** mostró una correlación negativa con los niveles de metilación del gen ESR1 en glándula mamaria de las enfermas. En sangre periférica de mujeres sanas se halló una correlación positiva entre la actividad física y el grado de metilación de RASSF1A.

La **adherencia a la Dieta Mediterránea**, por su parte, correlacionó positivamente, aunque de forma cercana a la significación, con los niveles de metilación génica de ESR1 en sangre periférica de las voluntarias sanas.

En la Tabla 20 se muestran las correlaciones obtenidas entre los parámetros nutricionales de **frecuencia de consumo de alimentos** y los datos moleculares. Así, la ingesta calórica diaria en enfermas se asoció a un mayor grado de metilación génica de BRCA1 y ESR1 en elementos formes, y de BRCA1 en glándula mamaria. En cuanto al consumo de hidratos de carbono, éste mostró una correlación positiva con el grado de metilación del gen RASSF1A en elementos formes de sanas. Por su parte, la ingesta de proteína correlacionó de forma positiva con los niveles de metilación global del ADN en tejido tumoral. A su vez, el consumo de proteína se asoció positivamente a un mayor grado de metilación de BRCA1 en glándula mamaria, y de BRCA1 y ESR1 en tumor. Por otro lado, la ingesta de lípidos totales no mostró correlaciones con los datos moleculares de la población de mujeres sanas. Sin embargo, al cuantificar el consumo en función del tipo de lípido, se hallaron correlaciones positivas entre el grado de metilación de BRCA1 y ESR1 en elementos formes de sanas y la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados totales, así como entre ESR1 y la ingesta de omega 6

y omega 3 tanto de origen marino como no marino. En cuanto a la población de enfermas, el consumo de lípidos totales correlacionó positivamente con los niveles de metilación global en sangre periférica y tumor. Al realizar el análisis en función del tipo de lípido, se observó una asociación entre la ingesta de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados del tipo omega 6 y el incremento de la metilación global en sangre periférica de enfermas, mientras que en tejido tumoral los niveles de metilación genómica correlacionaron con el consumo de ácidos grasos saturados y poliinsaturados omega 3 de origen marino. A nivel gen-específico, el grado de metilación de BRCA1, ESR1 y RASSF1A en elementos formes de enfermas se asoció al consumo de lípidos totales, así como de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. La metilación del gen ESR1 en elementos formes de enfermas también presentó una correlación negativa con la ingesta de omega 3 (marino). En cuanto a la metilación génica en glándula mamaria, se halló una correlación positiva entre el grado de metilación de BRCA1 y el consumo de omega 3 de origen marino, así como una asociación negativa entre RASSF1A y la ingesta de poliinsaturados totales y del tipo omega 6. En tejido tumoral, los niveles de metilación génica de BRCA1 correlacionaron positivamente con el consumo de lípidos totales, de ácidos grasos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados totales y omega 3 de origen no marino. La metilación de ESR1 en tumor también se asoció positivamente con la ingesta de ácidos grasos saturados. Por otro lado, el consumo de aceite de oliva no mostró ninguna asociación con relevancia estadística con los datos moleculares, y la ingesta de fibra únicamente correlacionó, de forma positiva, con el grado de metilación del gen ESR1 en glándula mamaria de enfermas. En cuanto al consumo de vitaminas, la ingesta de vitamina B₂ presentó correlaciones positivas con los niveles de metilación global en todos los tejidos analizados. A nivel gen-específico, el consumo de vitamina B₂ en las pacientes se asoció a un incremento en el grado de metilación del gen BRCA1 y ESR1 en elementos formes y tejido tumoral, así como de BRCA1 en glándula mamaria. La ingesta de vitamina B₆ en enfermas correlacionó positivamente con los niveles de metilación genómica y de BRCA1 en glándula mamaria, y con el grado de metilación de ESR1 en tumor. Por otro lado, el consumo de vitamina B₉ (folato) en enfermas se asoció positivamente con los niveles de metilación génica de ESR1, y de forma negativa con los de RASSF1A en glándula mamaria. Por último, la ingesta de vitamina B₁₂ correlacionó positivamente con el grado de metilación global del tejido tumoral, así como del gen BRCA1 en glándula mamaria y tumor.

	MET. GLOBAL			BRCA1			ESR1			RASSF1A		
	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T
HÁBITO TABÁQUICO												
No fumadoras	n	51	48	52	51	55	51	51	54	49	51	48
	m	84,36	82,74	81,57	9,67	10,58	11,09	12,97	12,48	2,71	8,22	15,66
Ex-fumadoras	n	7	11	10	11	11	11	11	11	7	8	11
	m	80,62	85,17	83,60	9,75	8,91	9,55	12,64	11,83	2,08	6,78	22,39
Fumadoras ocasionales	n	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	m	83,56	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,05	NA	NA
Fumadora < 10 cigarrillos/día	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4
	m	85,14	83,36	83,10	11,13	10,37	11,17	16,02	11,58	3,10	7,89	9,08
Fumadora > 10 cigarrillos/día	n	3	6	6	6	6	6	6	6	4	6	6
	m	84,67	84,18	83,63	9,02	9,87	10,72	14,77	9,56	3,08	10,36	13,99
<i>p-value</i>		0,109	0,858	0,875	0,481	0,525	0,359	0,777	0,445	0,869	0,795	0,370
CONSUMO ALCOHOL												
rho		0,383	-0,05	0,216	-0,048	0,105	-0,063	-0,046	0,346	0,198	-0,222	-0,045
n		24	53	52	54	54	54	55	57	24	50	54
<i>p-value</i>		0,064*	0,722	0,124	0,534	0,451	0,651	0,735	0,008**	0,353	0,121	0,755
ACTIVIDAD FÍSICA												
rho		0,266	0,005	-0,069	-0,052	0,068	-0,041	-0,283	0,016	0,415	0,092	0,016
n		24	53	52	54	57	54	55	57	24	50	54
<i>p-value</i>		0,208	0,970	0,625	0,719	0,613	0,582	0,766	0,902	0,043**	0,524	0,909
ADM												
rho		0,063	-0,098	-0,113	-0,138	-0,035	-0,060	-0,015	-0,213	-0,003	0,120	0,133
n		24	53	52	54	57	54	55	57	24	50	54
<i>p-value</i>		0,767	0,484	0,423	0,317	0,793	0,666	0,912	0,111	0,990	0,405	0,353

Tabla 19. Asociación entre parámetros de estilo de vida y datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pírosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pírosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pírosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, n: tamaño muestral, m: mediana, *p-value*: significación estadística, rho: coeficiente de correlación de Spearman, ADM: adherencia a la dieta mediterránea). **: correlaciones significativas ($p < 0,05$), *: correlaciones cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$). En verde se indican las correlaciones positivas con $p < 0,1$ y en rojo las negativas.

RESULTADOS

		MET. GLOBAL				BRCA1				ESR1				RASSF1A			
		SANAS EF	ENFERMAS EF	GM	T	SANAS EF	ENFERMAS EF	GM	T	SANAS EF	ENFERMAS EF	GM	T	SANAS EF	ENFERMAS EF	GM	T
FRECUENCIA DE CONSUMO																	
Energía total	rho	0,264	0,182	0,147	0,212	0,143	0,247	0,230	0,204	0,217	0,242	0,124	0,193	0,283	0,233	-0,231	0,009
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,212	0,192	0,300	0,124	0,504	0,072*	0,094*	0,128	0,310	0,077*	0,367	0,150	0,181	0,103	0,102	0,946
Hidratos de carbono	rho	0,276	0,130	0,164	-0,007	0,109	0,114	0,223	-0,051	0,100	0,170	0,091	0,048	0,438	0,208	-0,203	0,069
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,192	0,354	0,244	0,958	0,610	0,412	0,105	0,707	0,642	0,218	0,509	0,721	0,032**	0,146	0,153	0,615
Proteína	rho	0,174	0,142	0,095	0,292	-0,035	0,140	0,247	0,326	0,161	0,139	0,178	0,239	0,147	0,038	-0,011	0,085
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,416	0,312	0,500	0,032**	0,868	0,312	0,072*	0,013**	0,453	0,315	0,191	0,072*	0,491	0,791	0,940	0,541
Lípidos	rho	0,127	0,275	0,094	0,242	0,129	0,312	0,197	0,339	0,281	0,323	0,151	0,159	0,027	0,306	-0,175	-0,023
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,554	0,046**	0,508	0,077*	0,546	0,021**	0,153	0,009**	0,184	0,017**	0,269	0,236	0,900	0,031**	0,219	0,868
AG saturados	rho	0,292	0,234	0,124	0,244	-0,026	0,306	0,197	0,377	0,029	0,303	0,171	0,221	0,095	0,247	-0,126	-0,037
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,166	0,091*	0,379	0,074*	0,904	0,025**	0,152	0,004**	0,891	0,026**	0,213	0,097*	0,659	0,083*	0,379	0,785
AG monoinsaturados	rho	0,091	0,253	0,063	0,161	0,157	0,329	0,166	0,248	0,225	0,332	0,151	0,044	-0,014	0,321	-0,139	0,011
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,671	0,068*	0,656	0,244	0,463	0,015**	0,229	0,062*	0,290	0,014**	0,271	0,744	0,948	0,023**	0,329	0,936
AG poliinsaturados	rho	0,272	0,241	0,089	0,207	0,441	0,105	0,129	0,254	0,551	0,115	0,121	0,135	0,320	0,074	-0,234	<0,001
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,198	0,082*	0,528	0,132	0,031**	0,452	0,349	0,056*	0,005**	0,406	0,377	0,316	0,127	0,608	0,099*	0,996
AG Omega 6	rho	0,253	0,255	0,169	0,183	0,258	0,103	0,108	0,188	0,537	0,143	0,166	0,167	0,243	0,043	-0,294	-0,021
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,233	0,065*	0,231	0,186	0,223	0,460	0,436	0,159	0,006**	0,303	0,225	0,212	0,253	0,765	0,036**	0,878
AG Omega 3 (no marinos)	rho	0,343	0,142	0,160	0,156	0,222	0,066	0,089	0,278	0,373	0,043	0,166	0,146	0,223	0,024	-0,219	0,177
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,101	0,311	0,256	0,259	0,297	0,637	0,519	0,035**	0,072*	0,756	0,227	0,278	0,296	0,869	0,122	0,199
AG Omega 3 (marinos)	rho	-0,078	0,016	-0,005	0,232	0,305	-0,119	0,302	0,154	0,354	-0,234	-0,028	0,001	-0,044	-0,159	0,084	0,093
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,715	0,911	0,969	0,091*	0,147	0,389	0,026**	0,253	0,089*	0,088*	0,834	0,993	0,838	0,269	0,557	0,504
Aceite de Oliva	rho	-0,102	0,051	-0,077	0,006	0,028	0,167	0,160	0,129	0,177	0,179	0,102	-0,147	-0,146	0,230	-0,065	-0,024
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,635	0,714	0,584	0,963	0,897	0,227	0,246	0,335	0,408	0,194	0,455	0,274	0,495	0,108	0,649	0,859
Fibra	rho	0,073	0,149	0,162	0,075	-0,042	0,165	0,208	0,107	-0,012	0,218	0,242	0,216	0,245	0,159	-0,223	0,075
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,734	0,284	0,251	0,589	0,846	0,233	0,131	0,428	0,955	0,112	0,074*	0,105	0,248	0,268	0,115	0,588
Vitaminas																	
B2	rho	0,380	0,357	0,401	0,236	0,017	0,278	0,447	0,398	0,125	0,307	0,217	0,361	0,150	0,085	-0,048	0,120
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,067*	0,008**	0,003**	0,085*	0,937	0,041**	0,001**	0,002**	0,561	0,024**	0,111	0,005**	0,484	0,557	0,737	0,385
B6	rho	0,149	0,213	0,244	0,112	0,025	0,07	0,274	0,197	0,263	0,09	0,158	0,239	0,160	-0,046	-0,193	0,195
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,487	0,126	0,082*	0,418	0,905	0,611	0,045**	0,142	0,213	0,484	0,249	0,072*	0,455	0,753	0,175	0,157
B9	rho	0,218	0,220	0,206	0,017	0,039	0,161	0,226	0,060	0,184	0,203	0,230	0,205	0,219	0,088	-0,244	0,070
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,305	0,113	0,142	0,903	0,856	0,243	0,100	0,653	0,388	0,142	0,091*	0,125	0,303	0,539	0,084*	0,613
B12	rho	0,022	0,155	0,112	0,017	0,316	0,028	0,390	0,375	0,283	-0,054	0,054	0,161	-0,041	-0,173	0,126	0,046
	n	24	53	52	54	24	54	54	57	24	54	55	57	24	50	51	54
	p-value	0,919	0,266	0,428	0,003**	0,132	0,839	0,003**	0,004**	0,179	0,698	0,696	0,231	0,849	0,229	0,378	0,739

Tabla 20. Correlación entre parámetros nutricionales obtenidos de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pirosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pirosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pirosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, AG: ácidos grasos, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

A parte de las asociaciones realizadas entre los parámetros nutricionales obtenidos de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y los datos obtenidos a nivel molecular, también se evaluó la relación existente entre el perfil de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos y el patrón de metilación del ADN (Tablas 21-25).

En cuanto a los **ácidos grasos saturados** (Tabla 21), la metilación global del ADN en elementos formes de voluntarias sanas correlacionó con los niveles totales de saturados, así como con los de C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0 y C23:0 en las membranas de los eritrocitos. Esto mismo fue observado en la población de enfermas aunque sólo en el caso de C22:0 y C23:0. Por otro lado, la metilación génica de BRCA1 en sangre periférica de mujeres sanas correlacionó con la presencia de C16:0 en la membrana de eritrocitos, mientras que en enfermas correlacionó con los niveles de C18:0, C23:0 y C24:0, así como de ácidos grasos saturados totales. En tejido mamario sano, se detectó asociación positiva entre el grado de metilación de BRCA1 y los niveles de C23:0 en la membrana eritrocitaria. En relación al tumor, se hallaron asociaciones positivas entre los niveles de metilación de este gen supresor tumoral y la presencia de C17:0 y C23:0. Por lo que respecta a ESR1, se hallaron correlaciones positivas entre el grado de metilación de ESR1 en elementos formes y la cuantificación en las membranas eritrocitarias de C18:0 y C23:0 en la población de mujeres sanas, y de C18:0 y ácidos grasos saturados totales en la población de enfermas. En cuanto al tejido mamario, únicamente se halló asociación entre los niveles de C23:0 y el grado de metilación de ESR1 en glándula mamaria. En referencia al gen RASSF1A, los valores de saturados totales, así como los de C14:0, C16:0, C17:0 y C18:0 correlacionaron positivamente con la metilación de dicho gen en elementos formes de mujeres sanas. En enfermas, el aumento de metilación de RASSF1A en sangre periférica correlacionó tanto con los niveles totales de ácidos grasos saturados, como con los de C18:0 y C22:0 en la membrana de los eritrocitos. En tejido tumoral, el grado de metilación de RASSF1A correlacionó de forma positiva con la presencia en eritrocitos de C14:0, C16:0 y C17:0, y de manera inversa con la de C18:0 y C22:0.

En el caso de los **ácidos grasos monoinsaturados** (Tabla 22), la metilación global del ADN en elementos formes de mujeres sanas correlacionó positivamente con los niveles totales de ácidos grasos monoinsaturados, así como con los de c9-C18:1 (ácido oleico) y C24:1. En la población de enfermas, se hallaron asociaciones inversas entre la presencia de C16:1 y c11-C18:1 en la membrana eritrocitaria y el grado de metilación genómica en sangre periférica. En relación al tumor, la metilación global del ADN correlacionó, de forma negativa, con los niveles de C24:1 en las membranas de los eritrocitos. Por otro lado, la

metilación génica de BRCA1 en sangre periférica de las pacientes mostró correlaciones negativas con los valores en eritrocitos de C16:1, c9-C18:1, c11-C18:1 y con los niveles totales de ácidos grasos monoinsaturados. En cuanto al gen ESR1, se observaron asociaciones negativas entre el grado de metilación de dicho gen en sangre periférica de enfermas y los niveles totales de monoinsaturados, c9-C18:1 y c11-C18:1 en membrana eritrocitaria. Por otro lado, la metilación de ESR1 en glándula mamaria correlacionó positivamente con la presencia de C22:1 y C24:1 en eritrocitos, mientras que en tumor los niveles de C17:1 mostraron una asociación inversa con el grado de metilación de dicho supresor tumoral. Por último, la metilación génica de RASSF1A en elementos formes de enfermas correlacionó negativamente con los niveles totales de monoinsaturados, C16:1 y c9-C18:1. Por el contrario, la metilación de RASSF1A en tejido tumoral mostró correlaciones positivas con los niveles totales de monoinsaturados y c9-C18:1 en las membranas de los eritrocitos.

Por lo que respecta a los **ácidos grasos poliinsaturados omega 6** (Tabla 23), la metilación global del ADN en sangre periférica de mujeres sanas correlacionó negativamente con los niveles totales de ácidos grasos omega 6, así como con los de C18:2 (ácido linoleico), C20:2, C20:3 y C20:4 en la membrana de los eritrocitos. Contrariamente, la metilación genómica en elementos formes de enfermas presentó asociaciones positivas con los niveles de C20:2 y C20:3. El grado de metilación global en glándula mamaria correlacionó positivamente con la presencia de C20:2 en la membrana eritrocitaria, y en tumor con los niveles de C18:2. Por otro lado, la metilación génica de BRCA1 en elementos formes de mujeres sanas correlacionó de forma negativa con los niveles de C20:3 en las membranas de los eritrocitos. En el caso de las enfermas, el grado de metilación de BRCA1 en elementos formes, glándula mamaria y tumor se asoció positivamente con la presencia de C20:2 en eritrocitos. En cuanto al gen ESR1, el grado de metilación génica en sangre periférica de mujeres sanas correlacionó de forma negativa con los niveles totales de omega 6, C20:3 y C20:4 en las membranas eritrocitarias, mientras que en enfermas la correlación con C20:3 fue positiva. Por lo que respecta al tejido mamario, en glándula mamaria la metilación del gen ESR1 se asoció positivamente con los niveles de C18:3 y en tumor con los de C20:2. En referencia al gen RASSF1A, los niveles totales de omega 6 y C20:4 en las membranas de los eritrocitos correlacionaron negativamente con el grado de metilación de RASSF1A en elementos formes de mujeres sanas y en tumor. En el caso del tejido tumoral, también se halló una correlación negativa entre la metilación de RASSF1A y los niveles de C22:2 en las membranas eritrocitarias.

En relación a los **ácidos grasos poliinsaturados omega 3** (Tabla 24), la metilación global del ADN en elementos formes de mujeres sanas correlacionó positivamente con los niveles de C18:3, y de forma negativa con los niveles totales de omega 3 y C22:6 en las membranas de los eritrocitos. En el caso de la metilación gen-específica, únicamente se halló correlación, siendo ésta negativa, entre el grado de metilación del gen BRCA1 en sangre periférica de voluntarias sanas y los niveles de C20:5 en eritrocitos.

Por último, el ácido graso con isomería **trans** (t9-C18:1) (Tabla 25) no mostró asociaciones con relevancia estadística con los niveles de metilación global del ADN. En cuanto a la metilación gen-específica, los niveles de t9-C18:1 en las membranas de los eritrocitos de enfermas correlacionaron positivamente con el grado de metilación de ESR1 en glándula mamaria y de BRCA1 en tejido tumoral.

	MET. GLOBAL						BRCA1						ESR1						RASSF1A					
	SANAS			ENFERMAS			SANAS			ENFERMAS			SANAS			ENFERMAS			SANAS			ENFERMAS		
	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T	EF	GM	T			
MEMBRANA ERITROCITOS																								
C14:0	rho	0.132	-0.046	0.179	0.230	0.010	0.165	0.026	0.211	0.128	-0.079	0.059	0.467	0.029	0.168	0.299								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.013**		0.202	0.164	0.940	0.232	0.851	0.202	0.341	0.565	0.659	0.003**	0.827	0.246	0.029**								
C15:0	rho	0.178	-0.102	0.026	0.117	-0.095	0.115	-0.189	-0.007	-0.019	-0.133	-0.203	0.154	0.176	-0.223	0.202								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.297	0.451	0.856	0.425	0.482	0.480	0.163	0.966	0.887	0.337	0.131	0.354	0.194	0.124	0.146								
C16:0	rho	0.281	0.026	0.047	0.293	-0.038	0.117	0.039	0.146	0.010	0.011	0.121	0.310	-0.151	-0.101	0.342								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.096*	0.847	0.738	0.297	0.074*	0.777	0.398	0.382	0.937	0.937	0.369	0.058*	0.266	0.488	0.012**								
C17:0	rho	0.293	-0.050	-0.127	0.135	0.046	0.155	0.226	0.201	0.031	0.032	0.187	0.455	0.106	-0.038	0.328								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.083*	0.710	0.374	0.514	0.418	0.732	0.263	0.226	0.819	0.816	0.162	0.004**	0.433	0.72	0.016**								
C18:0	rho	0.279	0.196	0.087	0.22	0.328	-0.092	0.087	0.324	0.242	0.052	0.196	0.46	0.306	-0.096	-0.253								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.099**	0.144	0.542	0.341	0.184	0.013**	0.507	0.520	0.047**	0.070*	0.144	0.003**	0.022**	0.511	0.067*								
C20:0	rho	0.427	0.214	0.051	0.036	-0.016	-0.024	-0.157	0.271	-0.134	-0.198	-0.131	0.083	0.153	0.088	0.052								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.009**	0.109	0.722	0.955	0.827	0.906	0.864	0.100	0.318	0.150	0.332	0.618	0.259	0.545	0.709								
C22:0	rho	0.326	0.295	-0.011	-0.034	0.192	-0.005	0.086	0.202	0.067	-0.0314	-0.101	0.115	0.335	0.194	-0.269								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.052*	0.026**	0.937	0.584	0.839	0.153	0.968	0.223	0.621	0.822	0.454	0.492	0.011**	0.182	0.051*								
C23:0	rho	0.317	0.244	0.158	0.094	0.301	0.313	0.322	0.271	0.197	0.354	0.114	0.155	0.221	0.015	-0.006								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.059**	0.067*	0.266	0.744	0.574	0.023**	0.021**	0.099*	0.142	0.008**	0.397	0.352	0.102	0.918	0.965								
C24:0	rho	0.217	0.086	0.0002	-0.134	-0.082	0.277	-0.095	0.134	0.232	0.205	0.142	0.049	0.144	0.006	-0.235								
	n	36	57	0.998	52	38	57	54	56	38	57	54	38	56	49	53								
	p-value	0.204	0.524	0.344	0.625	0.036**	0.494	0.323	0.161	0.127	0.305	0.706	0.771	0.288	0.963	0.090								
TOTAL SATURADOS	rho	0.325	0.112	-0.001	0.023	0.167	0.345	-0.057	0.172	0.190	0.282	0.097	0.361	0.258	-0.142	-0.209								
	n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53								
	p-value	0.053*	0.405	0.993	0.871	0.314	0.008**	0.681	0.206	0.253	0.034**	0.486	0.026	0.054*	0.329	0.131								

Tabla 21. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos saturados en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pirosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pirosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pirosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

MEMBRANA ERITROCITOS	MET. GLOBAL				BRCAI				ESRI				RASSFIA				
	SANAS		ENFERMAS		SANAS		ENFERMAS		SANAS		ENFERMAS		SANAS		ENFERMAS		
	EF	GM	T		EF	GM	T		EF	GM	T		EF	GM	T		
C18:2 (Ác. linoleico)	rho	-0,461	0,211	-0,050	0,316	0,010	0,004	0,205	0,215	-0,125	0,059	0,107	0,084	-0,057	0,026	0,092	-0,107
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	0,004**	0,115	0,724	0,023**	0,952	0,974	0,137	0,112	0,536	0,455	0,662	0,441	0,536	0,731	0,846	0,528
C18:3 (Ác. γ-linoleico)	rho	-0,166	0,128	0,088	0,096	-0,072	-0,015	0,113	-0,067	-0,154	0,204	0,261	0,162	-0,074	-0,097	-0,141	-0,223
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	0,333	0,342	0,539	0,499	0,666	0,909	0,415	0,623	0,227	0,355	0,126	0,057*	0,227	0,656	0,477	0,334
C20:2 (Ác. eicosadienoico)	rho	-0,284	0,353	0,256	0,226	0,112	0,220	0,277	0,277	0,007	0,193	0,138	0,263	0,232	0,195	0,020	-0,037
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	0,092*	0,007**	0,069*	0,108	0,501	0,099*	0,042**	0,038**	0,048**	0,964	0,149	0,319	0,048**	0,160	0,149	0,888
C20:3 (DGLA)	rho	-0,325	0,279	0,065	0,049	-0,347	0,152	0,216	0,102	-0,45	0,241	0,085	-0,074	-0,238	0,133	-0,119	-0,096
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	0,053*	0,035**	0,650	0,731	0,033**	0,258	0,116	0,455	0,585	0,004**	0,071*	0,543	0,149	0,328	0,413	0,496
C20:4 (Ác. araquidónico)	rho	-0,295	0,024	0,019	-0,095	-0,216	0,061	-0,171	-0,054	-0,289	0,027	-0,003	0,075	-0,313	0,094	0,029	-0,295
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	0,080*	0,856	0,894	0,503	0,193	0,653	0,217	0,692	0,579	0,077*	0,839	0,984	0,579	0,055*	0,488	0,032**
C22:2 (Ác. docosadienoico)	rho	NA	-0,153	0,144	-0,173	NA	-0,207	0,026	-0,154	NA	-0,093	0,064	-0,248	NA	-0,136	-0,225	-0,304
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	NA	0,254	0,313	0,221	NA	0,122	0,848	0,256	NA	0,489	0,644	0,063*	NA	0,317	0,121	0,026**
TOTAL OMEGA 6	rho	-0,429	0,203	0,087	0,110	-0,143	0,081	0,072	0,082	-0,334	0,165	0,147	0,079	-0,302	0,140	0,029	-0,349
	n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57	38	56	49	53
	p-value	0,008**	0,130	0,541	0,436	0,392	0,546	0,604	0,549	0,558	0,040**	0,218	0,289	0,558	0,065*	0,303	0,838

Tabla 23. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos poliinsaturados omega 6 en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCAI: metilación génica de BRCAI -pirosecuenciación-, ESRI: metilación génica de ESRI -pirosecuenciación-, RASSFIA: metilación génica de RASSFIA -pirosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

	MET. GLOBAL			BRCA1			ESR1			RASSF1A		
	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T
MEMBRANA ERITROCITOS												
C18:3												
(Ác. α-linolénico)												
rho	0,314	-0,199	-0,017	0,049	0,051	-0,138	-0,124	0,004	0,166	0,082	-0,085	-0,115
n	36	57	51	38	57	54	56	38	57	54	57	53
p-value	0,062*	0,136	0,380	0,902	0,766	0,319	0,363	0,979	0,216	0,555	0,529	0,411
C20:5												
(EPA)												
rho	-0,205	0,099	0,018	0,005	-0,279	0,178	0,122	0,036	0,113	0,014	0,071	0,092
n	36	57	51	52	38	57	54	38	57	54	57	53
p-value	0,231	0,463	0,897	0,972	0,089*	0,185	0,380	0,829	0,403	0,918	0,601	0,512
C22:6												
(DHA)												
rho	-0,374	0,010	-0,019	-0,113	-0,206	0,197	0,041	-0,087	0,206	0,061	0,086	-0,061
n	36	57	51	52	38	57	54	38	57	54	57	53
p-value	0,024**	0,941	0,892	0,426	0,215	0,140	0,769	0,602	0,123	0,661	0,522	0,665
TOTAL OMEGA 3												
rho	-0,366	0,008	-0,009	-0,082	-0,234	0,183	0,033	-0,110	0,182	0,042	0,086	-0,058
n	36	57	51	52	38	57	54	38	57	54	57	53
p-value	0,028**	0,952	0,945	0,565	0,157	0,172	0,813	0,509	0,175	0,764	0,523	0,679

Tabla 24. Correlación entre la cuantificación de ácidos grasos polinsaturados omega 3 en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pirosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pirosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pirosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

	MET. GLOBAL			BRCA1			ESR1			RASSF1A		
	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T	SANAS EF	ENFERMAS GM	T
MEMBRANA ERITROCITOS												
t9-C18:1												
(Ác. elaidico)												
rho	-0,057	0,124	-0,067	-0,0004	-0,052	0,140	0,008	0,233	-0,232	0,124	0,309	0,211
n	36	57	51	52	38	57	54	56	38	57	54	57
p-value	0,741	0,354	0,641	0,997	0,754	0,297	0,954	0,084*	0,160	0,357	0,023**	0,116

Tabla 25. Correlación entre la cuantificación del ácido graso con isomería trans (ácido elaidico) en las membranas de los eritrocitos y los datos moleculares de los distintos tejidos. (MET. GLOBAL: metilación global del ADN, BRCA1: metilación génica de BRCA1 -pirosecuenciación-, ESR1: metilación génica de ESR1 -pirosecuenciación-, RASSF1A: metilación génica de RASSF1A -pirosecuenciación-, EF: elementos formes, GM: glándula mamaria, T: tumor, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

B. ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL

1. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES

1.1. Niveles de expresión génica en glándula mamaria a diferentes edades

Gen RASSF1A

Los resultados de la expresión génica de RASSF1A mostraron una gran variabilidad a lo largo del tiempo, presentando diferentes tendencias durante la adolescencia (36 y 51 días de edad) y hasta los 100 días de edad, y en la etapa adulta (100 días y final del ensayo). En todos los grupos excepto en Mip, el valor de expresión más elevado se alcanzó a los 100 días de edad y descendió a los 246 días (Figura 55-A).

En relación con la dieta experimental, únicamente se obtuvieron diferencias al final del ensayo, observándose una disminución en los niveles de expresión de RASSF1A en los grupos de dieta de aceite de oliva respecto al control, y en Oip respecto Mip (Figura 55-B).

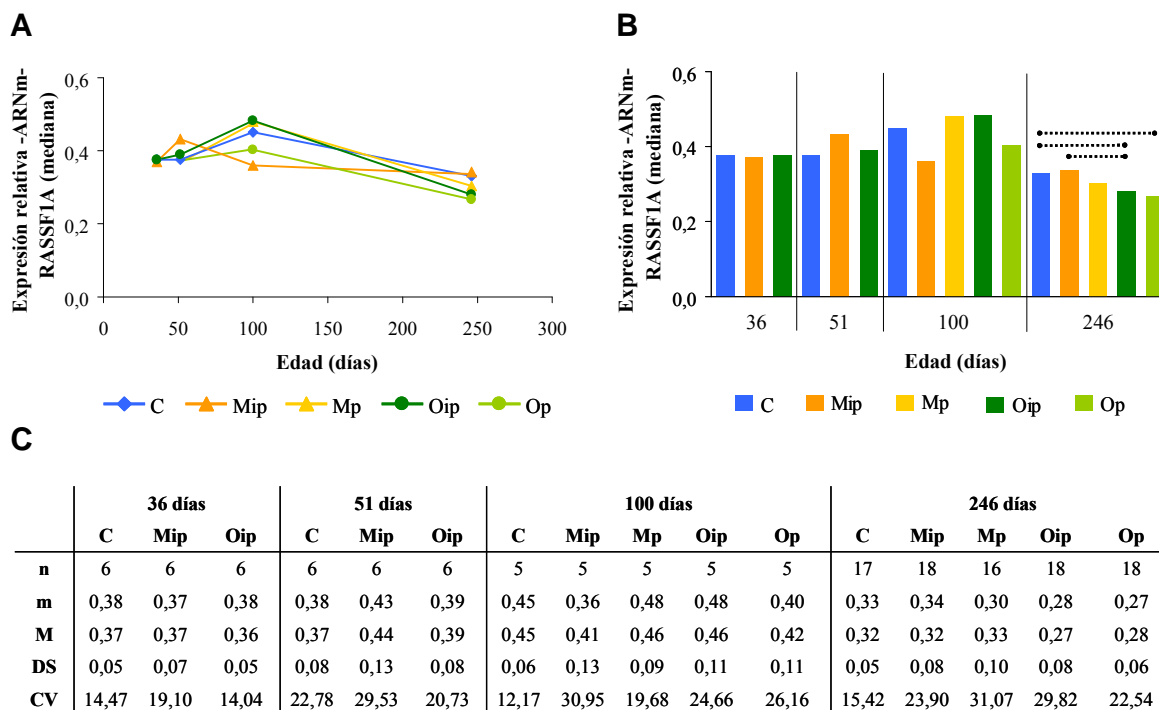


Figura 55. Expresión relativa del ARNm de RASSF1A en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Niveles de ARNm de RASSF1A en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación (0,05 < p < 0,1).

Gen TIMP3

La expresión génica de TIMP3 mostró también diferentes tendencias durante la adolescencia y en la etapa adulta. Así, los niveles de ARNm de TIMP3 incrementaron de los 36 a los 100 días en el grupo control, mientras que disminuyeron en los grupos Mip y Oip. En edad adulta (de 100 a 246 días), la expresión de TIMP3 disminuyó en todos los grupos experimentales (Figura 56-A).

En cuanto al efecto de la dieta, sólo se observaron diferencias al final del ensayo, concretamente una disminución significativa de la expresión génica de TIMP3 en Mp respecto al control (Figura 56-B).

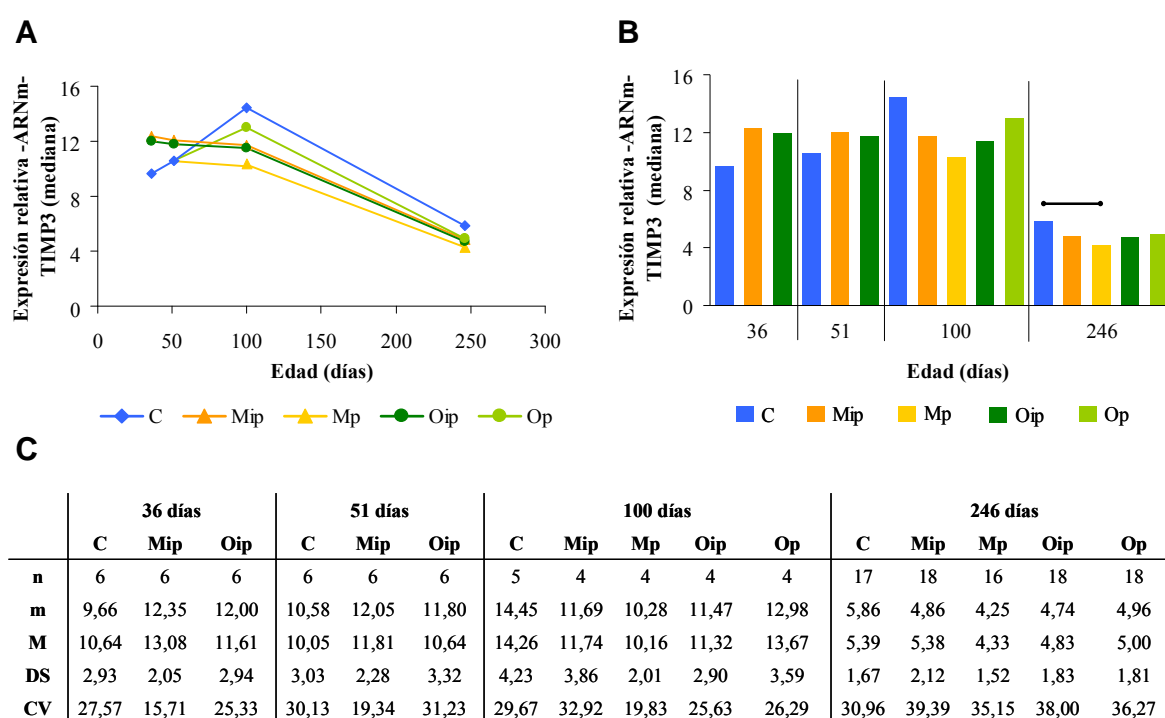


Figura 56. Expresión relativa del ARNm de TIMP3 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Niveles de ARNm de TIMP3 en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Gen CDKN2c

Los niveles de expresión génica de CDKN2c en el grupo control y Mip siguieron un perfil similar a lo largo del tiempo, siendo los valores de Mip siempre inferiores al control. En ambos grupos, se observó un descenso en la expresión de CDKN2c a 51 días de edad, tal disminución fue muy sutil en el caso de Oip. En los tres grupos, dicho descenso fue seguido

de un aumento en los niveles de expresión a 100 días para, posteriormente, disminuir al final del ensayo (Figura 57-A).

Por lo que respecta al efecto de la dieta, los valores de expresión de CDKN2c en los grupos de aceite de oliva fueron inferiores a los del resto durante todo el ensayo, excepto a 246 días. Así, a 36 días de edad la expresión de CDKN2c fue significativamente menor en Oip respecto al control. Tales diferencias no obtuvieron significación estadística a 51 días de edad. Sin embargo, a 100 días el grupo Op presentó niveles inferiores en comparación con el control, Mip y Mp. Al final del ensayo, se observó una disminución en la expresión génica de CDKN2c de todos los grupos de dieta hiperlipídica respecto al control. Al analizar dichos grupos entre sí, destacó la disminución en los niveles relativos de Mip comparados con Mp y Oip (Figura 57-B).

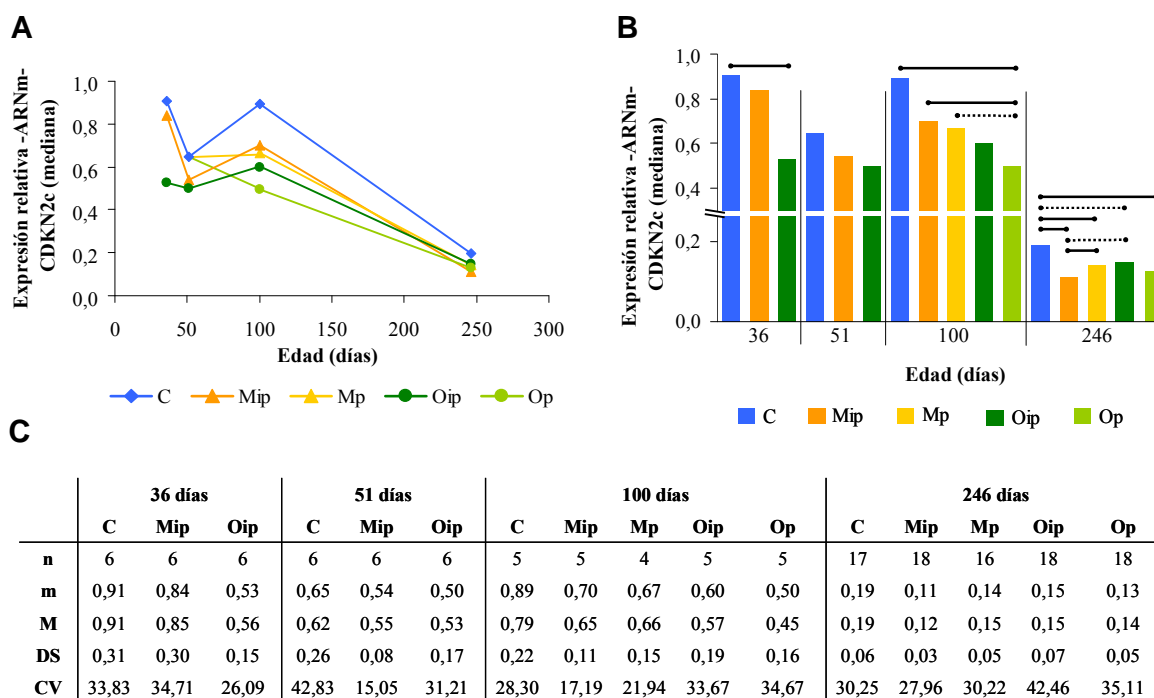


Figura 57. Expresión relativa del ARNm de CDKN2c en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Niveles de ARNm de CDKN2c en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

1.2. Niveles de expresión génica en adenocarcinomas mamarios

El análisis de los niveles de ARNm de RASSF1A en adenocarcinomas mostró una disminución significativa en los grupos de dieta de aceite de oliva respecto al resto de grupos (Figura 58-A). Por lo que respecta a la expresión génica de TIMP3, se observó una disminución en los niveles de Mp y de ambos grupos de dieta de aceite de oliva en comparación con el control (Figura 58-B). En cuanto a los niveles de expresión de CDKN2c, no se obtuvieron diferencias significativas en las comparaciones realizadas entre los grupos experimentales (Figura 58-C).

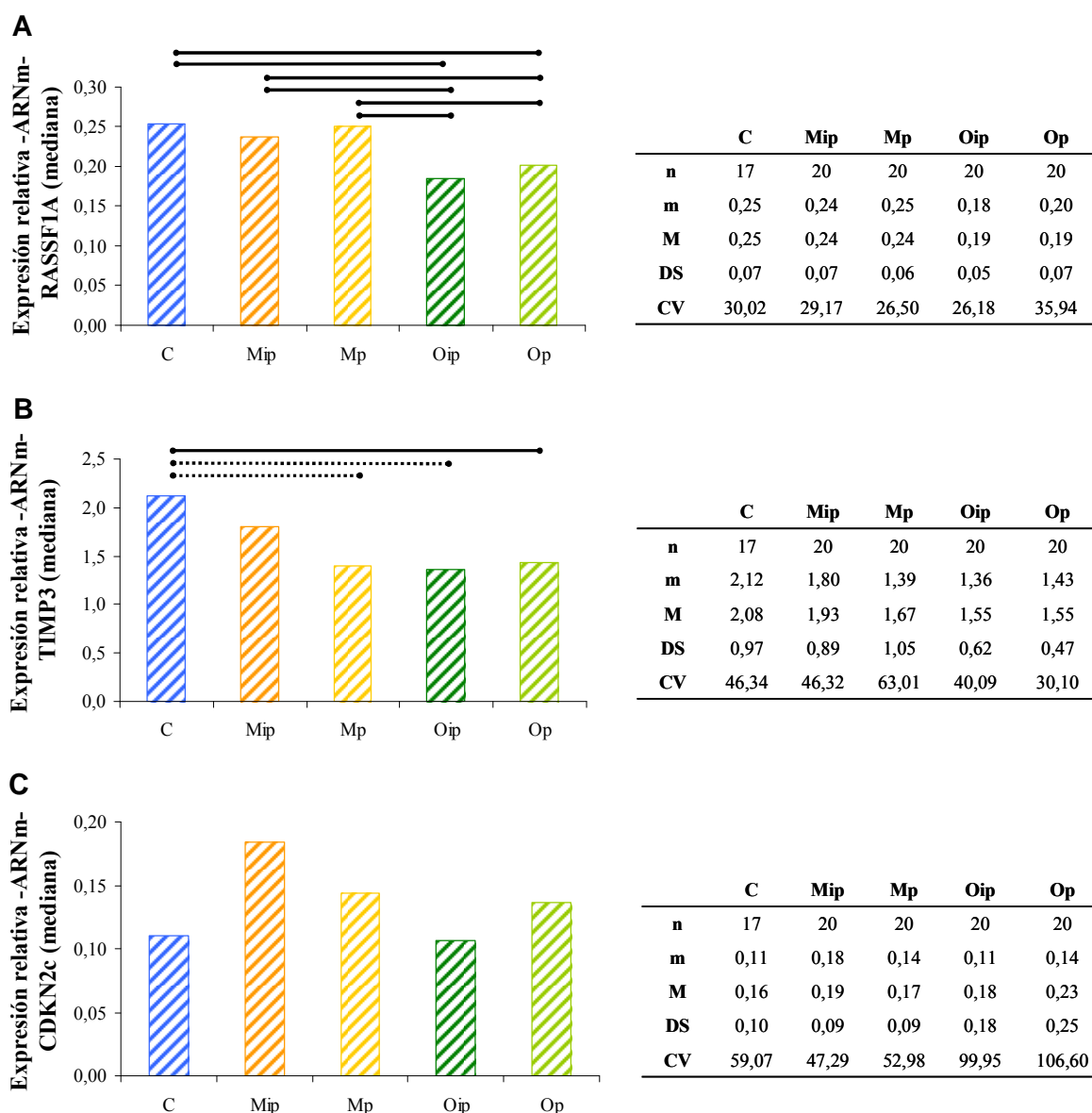


Figura 58. Expresión relativa del ARNm de RASSF1A (A), TIMP3 (B) y CDKN2c (C) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

1.3. Comparación de los niveles de expresión génica entre ambos tejidos

El análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm de RASSF1A y TIMP3 obtenidos en glándula mamaria y adenocarcinomas mostró en ambos casos una disminución significativa en tumor en todos los grupos experimentales (Figura 59-A y 59-B respectivamente). En cuanto a los niveles de ARNm de CDKN2c, únicamente se halló un aumento significativo en adenocarcinomas en relación a la glándula mamaria en el grupo Mip (Figura 59-C).

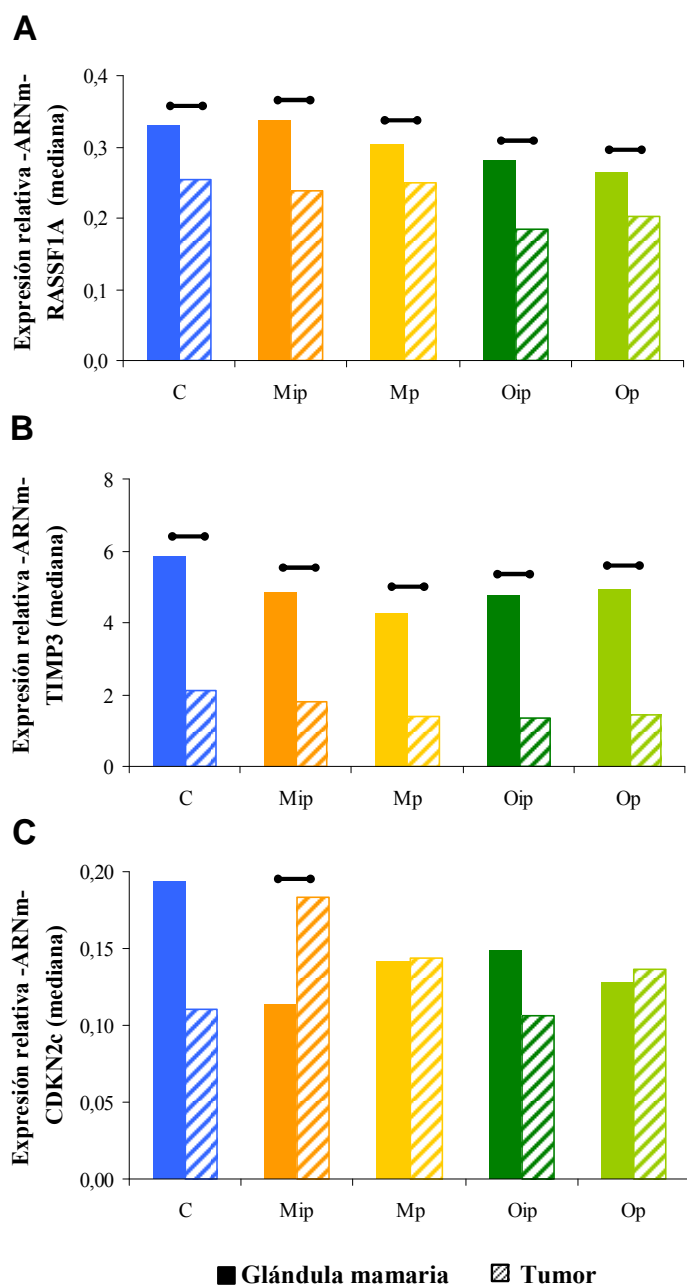


Figura 59. Comparación de los niveles de expresión relativa del ARNm de RASSF1A (A), TIMP3 (B) y CDKN2c (C) en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: METILACIÓN DEL ADN

El estudio del estado de metilación del ADN se basó tanto en la determinación de los niveles de metilación global del genoma, como en el análisis de la metilación gen-específica de los genes RASSF1A y TIMP3.

2.1. Metilación global del genoma

Por lo que respecta a la **glándula mamaria**, los niveles de metilación global mostraron variaciones a lo largo del tiempo en todos los grupos experimentales, destacando descensos durante la fase de pubertad, fundamentalmente de los 24 a los 36 días de edad, así como en la etapa adulta (de los 100 días hasta el final del ensayo) (Figura 60-A). En cuanto al efecto de la dieta, el grupo Oip mostró los mayores niveles de metilación genómica, siendo este aumento cercano a la significación a 36 días comparado con el grupo Mip, y a 51 días en comparación con el grupo control (Figura 60-B).

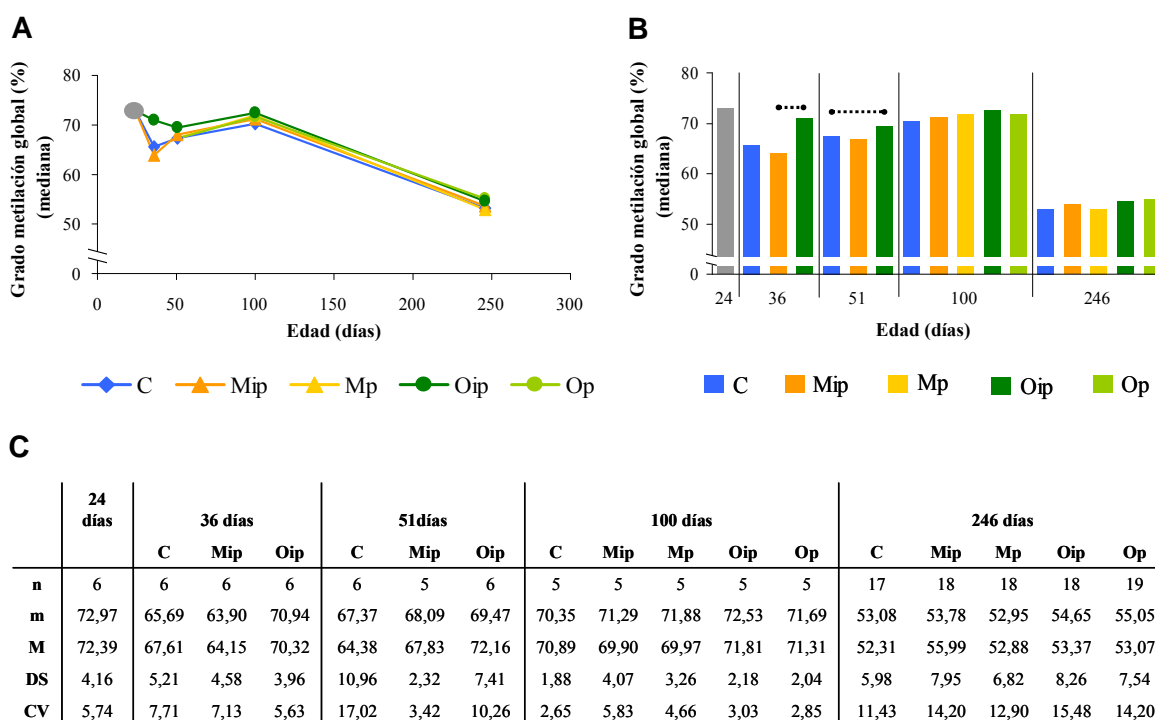


Figura 60. Grado de metilación global del ADN en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Grado de metilación global (%) del ADN en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). 24 días: grupo no alimentado con dieta experimental. A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación (0,05<p<0,1).

En **adenocarcinomas mamarios**, los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva destacaron por presentar los mayores niveles de metilación global, de forma significativa para Oip y cercana a la significación para Op, respecto al grupo control (Figura 61).

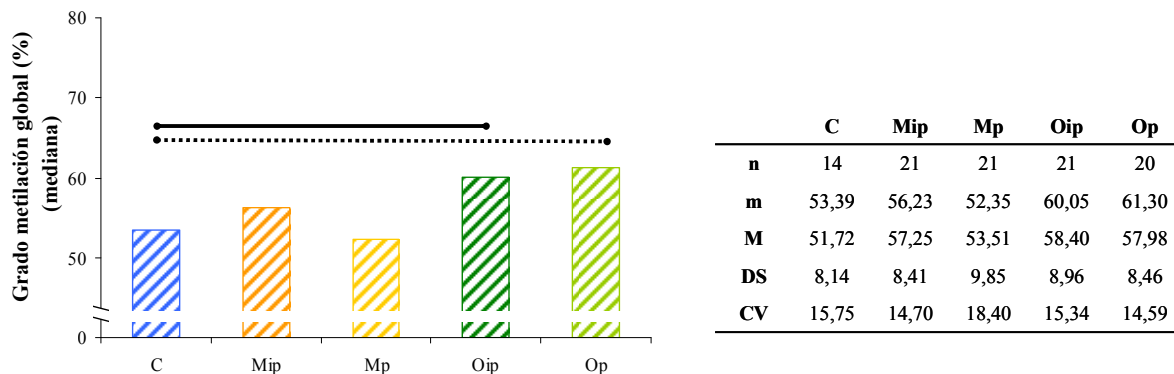


Figura 61. Grado de metilación global del ADN en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

La **comparación entre ambos tejidos** de los niveles de metilación global al final del ensayo para cada grupo experimental mostró un incremento en los adenocarcinomas mamarios de los grupos Oip ($p < 0,05$) y Op ($0,05 < p < 0,1$) (Figura 62).

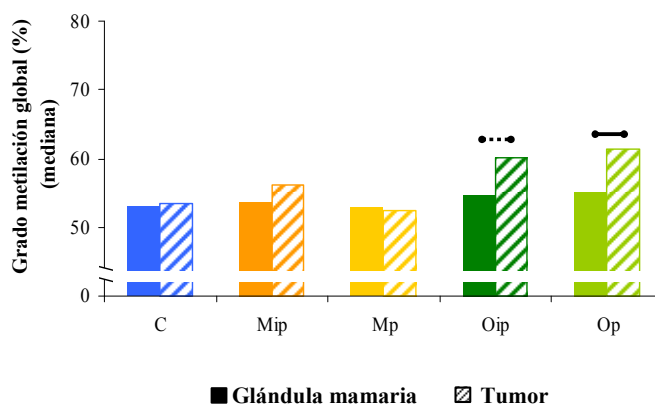


Figura 62. Comparación del grado de metilación global del ADN entre glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

2.2 Metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3

La evaluación de la metilación gen-específica se realizó de forma cualitativa para el gen RASSF1A, y de manera cuantitativa para dicho gen así como para TIMP3.

Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A

En primer lugar, se procedió a determinar la metilación de forma cualitativa por “MSP” de una secuencia presente en la región promotora del gen RASSF1A, en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo (Figura 63).

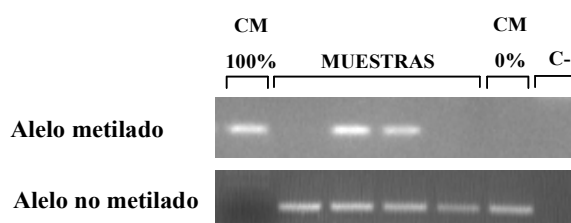


Figura 63. Imagen representativa de la detección del alelo metilado y no metilado en la determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A por “MSP”. CM 100%: ADN control 100% metilado, CM 0%: ADN control 0% metilado, C-: control negativo.

En **glándula mamaria**, el 100% de las muestras analizadas presentaron el alelo no metilado de RASSF1A, independientemente del grupo experimental. Por lo que respecta al alelo metilado, el porcentaje de muestras donde se detectó dicho alelo disminuyó en todos los grupos de dietas hiperlipídicas, siendo estadísticamente significativas las diferencias respecto al control en los grupos Mip, Mp y Oip. A su vez, ambos grupos de dieta de aceite de oliva presentaron niveles superiores de detección del alelo metilado en comparación con el grupo Mip ($p < 0,05$) (Figura 64).

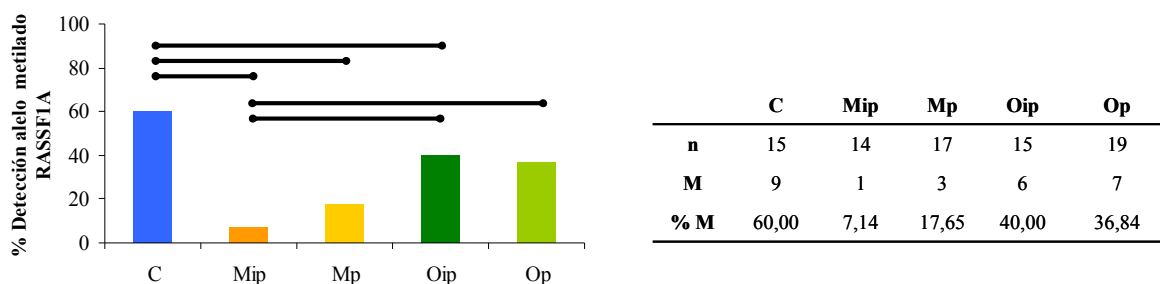


Figura 64. Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A en glándula mamaria al final del ensayo. Porcentaje de detección del alelo metilado para el gen RASSF1A por “MSP”. n: tamaño muestral, M: número de muestras con alelo metilado, %M: porcentaje de detección del alelo metilado. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En referencia a los resultados en **adenocarcinomas mamarios**, tal y como sucedía en glándula mamaria, el 100% de las muestras analizadas presentaron alelo no metilado para el gen RASSF1A. En cuanto a la detección del alelo metilado, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 65).

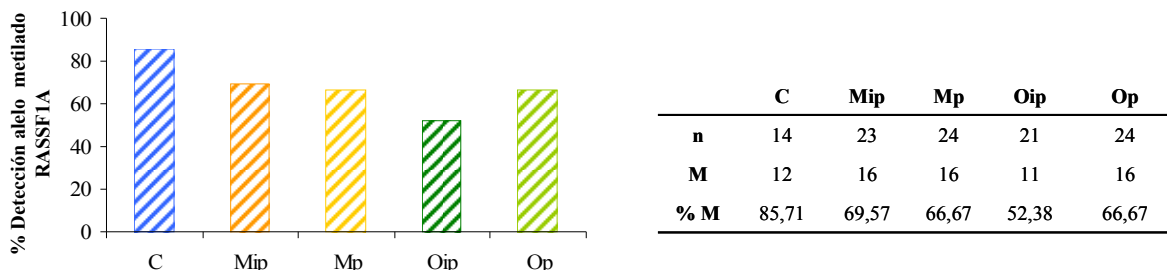


Figura 65. Determinación cualitativa de la metilación del gen RASSF1A en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. Porcentaje de detección del alelo metilado para el gen RASSF1A por “MSP”. n: tamaño muestral, M: número de muestras con alelo metilado, %M: porcentaje de detección del alelo metilado.

La **comparación entre ambos tejidos** mostró un incremento del porcentaje de detección del alelo metilado de RASSF1A en adenocarcinomas respecto a glándula mamaria en todos los grupos experimentales, de forma significativa en Mip y Mp, y cercano a la significación en el caso del grupo Op (Figura 66-A). Al realizar dicha comparación independientemente del grupo experimental (Figura 66-B), se obtuvo también un incremento significativo en el porcentaje de detección del alelo metilado en adenocarcinomas, presentando valores en ambos tejidos (GM: 32,50%, T: 66,98%) similares a los obtenidos por “MSP” en el estudio en humanos (GM: 40,45%, T: 79,78%).

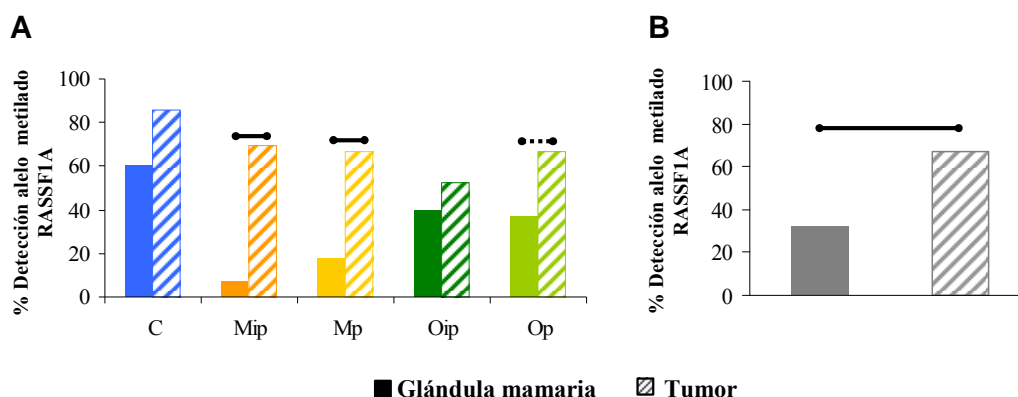


Figura 66. Comparación de las frecuencias de metilación del gen RASSF1A en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. Comparación de las frecuencias de metilación en cada grupo experimental (A) e independientemente del grupo (B). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Determinación cuantitativa de la metilación del gen RASSF1A y TIMP3

La determinación cuantitativa del grado de metilación de RASSF1A y TIMP3 se realizó mediante amplificación por PCR y posterior pirosecuenciación de secuencias presentes en la región promotora de ambos genes (Figura 67).

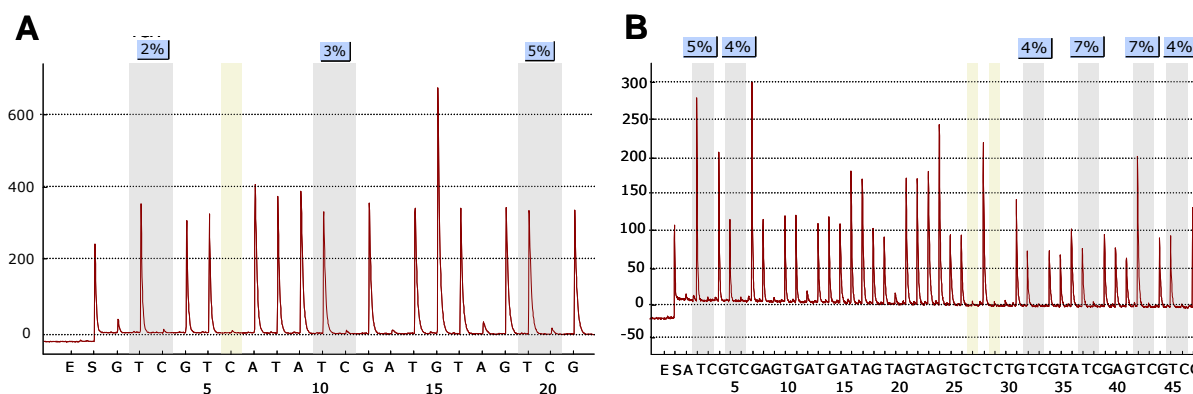


Figura 67. Pirogramas representativos de la determinación cuantitativa de la metilación de los genes RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en el estudio en el modelo experimental. Enmarcado en color azul se indica el grado de metilación (%) de cada una de las posiciones CpG analizadas en cada gen.

En todas las muestras analizadas se detectó metilación tanto para el gen RASSF1A como para TIMP3.

En **glándula mamaria**, los grupos de dietas hiperlipídicas de aceite de maíz presentaron un incremento significativo de la metilación de RASSF1A respecto al control. A su vez, el grado de metilación detectado en el grupo Mip fue superior al de los grupos Mp y Oip (Figura 68-A). En cuanto a la metilación del gen TIMP3, el grupo Mip mostró los mayores niveles de metilación en comparación con el grupo control y con ambos grupos de dieta de aceite de oliva (Figura 68-B).

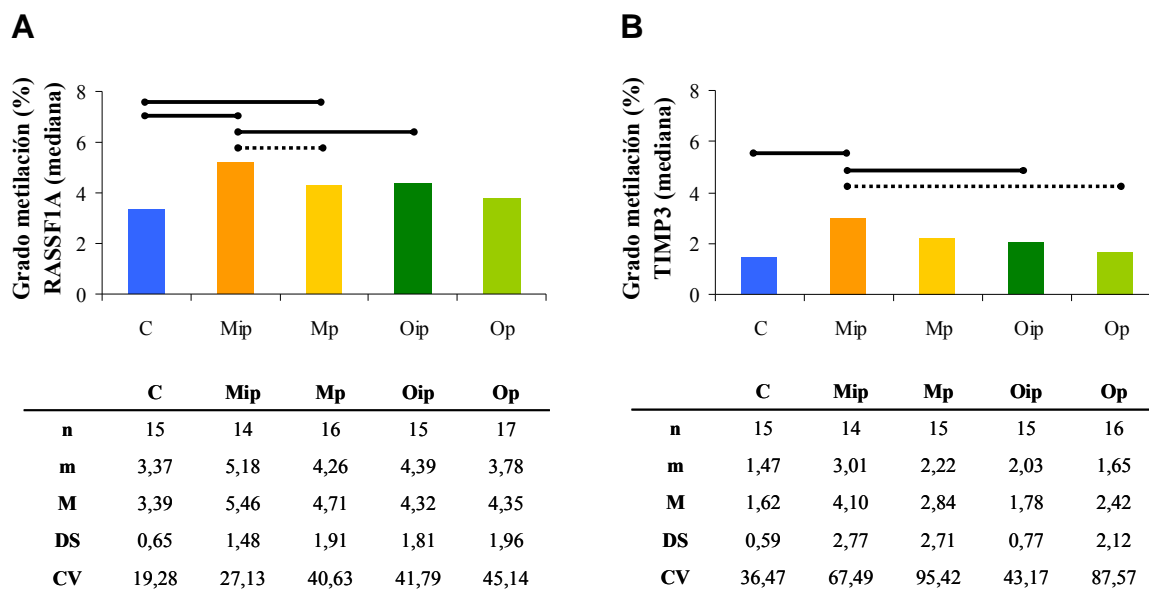


Figura 68. Grado de metilación del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en glándula mamaria al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Paralelamente, se realizó un análisis del porcentaje de muestras de los grupos de dieta hiperlipídica cuyo grado de metilación de RASSF1A y TIMP3 era superior a la mediana del grupo control (“cut-off” ó punto de corte de hipermetilación), tal y como se muestra en la Tabla 26. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo de la frecuencia de hipermetilación de RASSF1A (Tabla 26-A) y TIMP3 (Tabla 26-B) en el grupo Mip.

	Mip	Mp	Oip	Op
n	14	16	15	17
n > cut-off (C: 3,37)	14	11	10	9
n < cut-off (C: 3,37)	0	5	5	8
% Hipermetilación	100	68,75	66,66	52,94
Significación	$p < 0,05$	ND	ND	ND

	Mip	Mp	Oip	Op
n	14	15	15	16
n > cut-off (C: 1,47)	12	9	11	9
n < cut-off (C: 1,47)	2	6	4	7
% Hipermetilación	85,71	60	73,33	56,25
Significación	$p < 0,05$	ND	ND	ND

Tabla 26. Frecuencia de hipermetilación (%) del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) respecto al grupo control en glándula mamaria al final del ensayo. n: tamaño muestral, n>cut-off: número de muestras cuyo valor de metilación supera el “cut-off” de RASSF1A (mediana del grupo control: 3,37) ó de TIMP3 (mediana del grupo control: 1,47), n<cut-off: número de muestras cuyo valor de metilación es inferior al “cut-off” de RASSF1A (control: 3,37) ó de TIMP3 (control: 1,47), % Hipermetilación: porcentaje de muestras que presentan hipermetilación (grado de metilación superior a la mediana del grupo control) para el gen RASSF1A ó TIMP3, significación: significación obtenida en el test de la ji-cuadrado, ND: diferencias no significativas.

En **adenocarcinomas mamarios**, el grado de metilación del gen RASSF1A aumentó significativamente en todos los grupos de dieta hiperlipídica excepto en el grupo Mp. Los niveles de metilación de RASSF1A detectados en el grupo Mip fueron superiores a los de Mp, el cual presentó valores inferiores a los de los grupos de dieta de aceite de oliva (Figura 69-A). En cuanto al gen TIMP3, los grupos de dieta de aceite de maíz fueron los que presentaron mayores niveles de metilación. En este sentido, el grupo Mip mostró un incremento respecto al grupo control. El grupo Op presentó una disminución significativa del grado de metilación de TIMP3 en comparación con el resto de grupos de dietas hiperlipídicas (Figura 69-B).

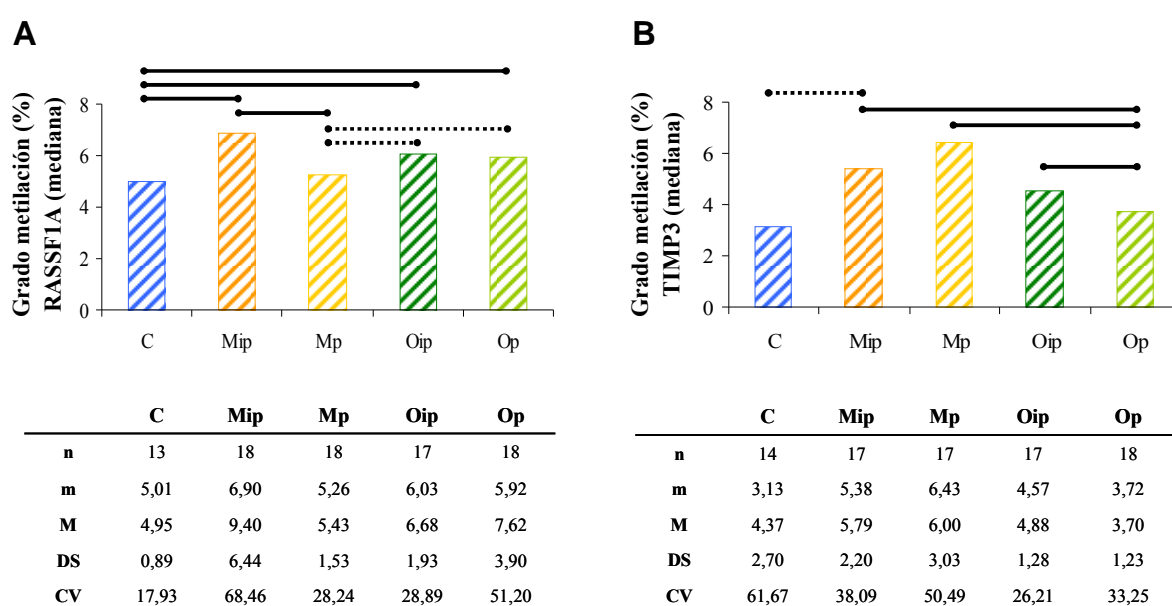


Figura 69. Grado de metilación del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

En adenocarcinomas mamarios también se determinó la frecuencia de hipermetilación de RASSF1A y TIMP3 en cada grupo experimental respecto al control, tal y como se muestra en la Tabla 27. Por lo que respecta al gen RASSF1A, se detectó un incremento significativo del porcentaje de hipermetilación en Mip, y cercano a la significación en Oip (Tabla 27-A). Así, ambos grupos (Mip y Oip) incrementaron tanto el grado como la frecuencia de hipermetilación del gen RASSF1A, mientras que Op únicamente mostró un aumento en el grado de metilación de dicho gen. Por otro lado, la frecuencia de hipermetilación del gen TIMP3 incrementó en todos los grupos de dietas hiperlipídicas, excepto en Op (Tabla 27-B).

A					B				
	Mip	Mp	Oip	Op		Mip	Mp	Oip	Op
n	18	18	17	18	n	17	17	17	18
n> cut-off (C:5,01)	15	9	14	12	n> cut-off (C:3,13)	16	14	16	13
n<cut-off (C: 5,01)	3	9	3	6	n<cut-off (C: 3,13)	1	3	1	5
% Hipermetilación	83,33	50	82,35	66,66	% Hipermetilación	94,12	82,35	94,12	72,22
Significación	p<0,05	ND	0.05<p<0.1	ND	Significación	p<0,05	0.05<p<0.1	p<0,05	ND

Tabla 27. Frecuencia de hipermetilación (%) del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) respecto al grupo control en adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. n: tamaño muestral, n>cut-off: número de muestras cuyo valor de metilación supera el “cut-off” de RASSF1A (mediana del grupo control: 5,01) ó de TIMP3 (mediana del grupo control: 3,13), n<cut-off: número de muestras cuyo valor de metilación es inferior al “cut-off” de RASSF1A (control: 5,01) ó de TIMP3 (control: 3,13), % Hipermetilación: porcentaje de muestras que presentan hipermetilación (grado de metilación superior a la mediana del grupo control) para el gen RASSF1A ó TIMP3, significación: significación obtenida en el test de la ji-cuadrado, ND: diferencias no significativas.

La **comparación entre ambos tejidos** para cada grupo experimental puso de manifiesto un incremento significativo del grado de metilación de la región promotora de los genes supresores tumorales RASSF1A (Figura 70-A) y TIMP3 (Figura 70-B) en adenocarcinomas respecto a glándula mamaria.

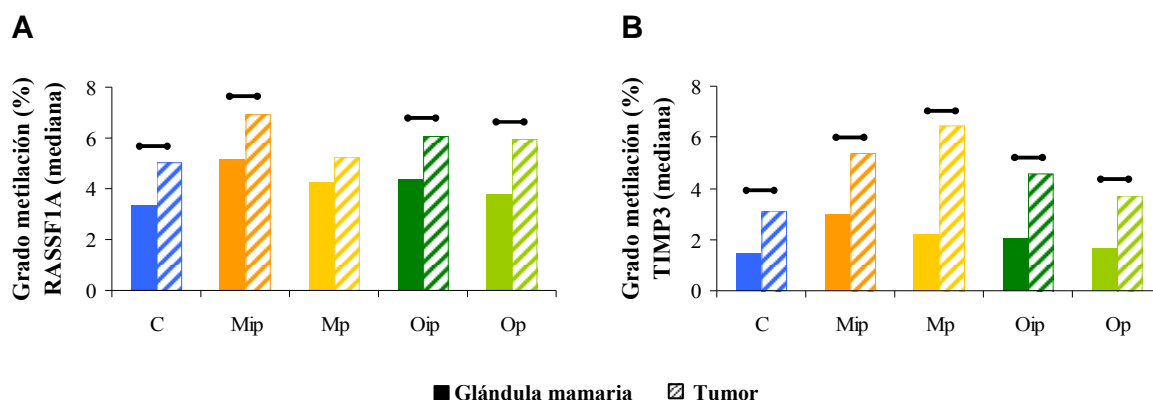


Figura 70. Comparación del grado de metilación del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas (p<0,05).

A su vez, se evaluó el efecto del cáncer sobre la frecuencia de hipermetilación de los genes RASSF1A y TIMP3 en cada grupo experimental (Tabla 28). Los adenocarcinomas mamarios de todos los grupos experimentales mostraron un incremento de la frecuencia de hipermetilación del gen RASSF1A, excepto el grupo Mip (Tabla 28-A), y de TIMP3 (Tabla 28-B).

A

	C	Mip	Mp	Oip	Op
cut-off _(GM)	3,37	5,18	4,26	4,39	3,78
n	13	18	18	17	18
n>cut-off _(GM)	13	13	14	15	18
n<cut-off _(GM)	0	5	4	2	0
% Hipermetilación	100	72,22	77,77	88,23	100
Significación	p<0,05	ND	0.05<p<0.1	p<0,05	p<0,05

B

	C	Mip	Mp	Oip	Op
cut-off _(GM)	1,47	3,01	2,22	2,03	1,65
n	14	17	17	17	18
n>cut-off _(GM)	14	17	14	17	17
n<cut-off _(GM)	0	0	3	0	1
% Hipermetilación	100	100	82,35	100	94,44
Significación	p<0,05	p<0,05	0.05<p<0.1	p<0,05	p<0,05

Tabla 28. Frecuencia de hipermetilación (%) del gen RASSF1A (A) y TIMP3 (B) en adenocarcinomas mamarios respecto a glándula mamaria al final del ensayo. cut-off_(GM): mediana del grado de metilación de la glándula mamaria en cada grupo experimental, n: tamaño muestral de adenocarcinomas mamarios, n>cut-off_(GM): número de muestras de adenocarcinomas cuyo valor de metilación supera el “cut-off_(GM)” de RASSF1A ó de TIMP3 para cada grupo experimental, n<cut-off_(GM): número de muestras de adenocarcinomas cuyo valor de metilación es inferior al “cut-off_(GM)” de RASSF1A ó de TIMP3 para cada grupo experimental, % Hipermetilación: porcentaje de muestras de adenocarcinomas que presentan hipermetilación (grado de metilación superior a la mediana de la glándula mamaria) para el gen RASSF1A ó TIMP3, significación: significación obtenida en el test de la ji-cuadrado, ND: diferencias no significativas.

2.3 Caracterización de las enzimas ADN metiltransferasas

Para profundizar en los mecanismos epigenéticos responsables de las alteraciones en los patrones de metilación del ADN descritos en este trabajo, se procedió a determinar los niveles de expresión génica de las ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) y a analizar su actividad enzimática total.

2.3.1 Expresión génica de ADN metiltransferasas

Expresión de ADN metiltransferasas en glándula mamaria

En glándula mamaria el análisis de los niveles de expresión relativa de **DNMT1** mostró pequeñas fluctuaciones a lo largo del tiempo, sin evidenciar un patrón común entre los distintos grupos experimentales (Figura 71-A). En cuanto al efecto de la dieta, no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos ni a 36 ni a 51 días de edad. Sin embargo, a 100 días se detectó una tendencia al incremento en los niveles de DNMT1 en ambos grupos de dieta de aceite de oliva respecto al grupo control. A su vez, el grupo Op presentó valores de expresión de DNMT1 significativamente superiores a los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Al final del ensayo (246 días), se detectó un aumento en los niveles de

expresión de DNMT1 en el grupo Mip en comparación con los grupos control, Mp y Op (Figura 71-B).

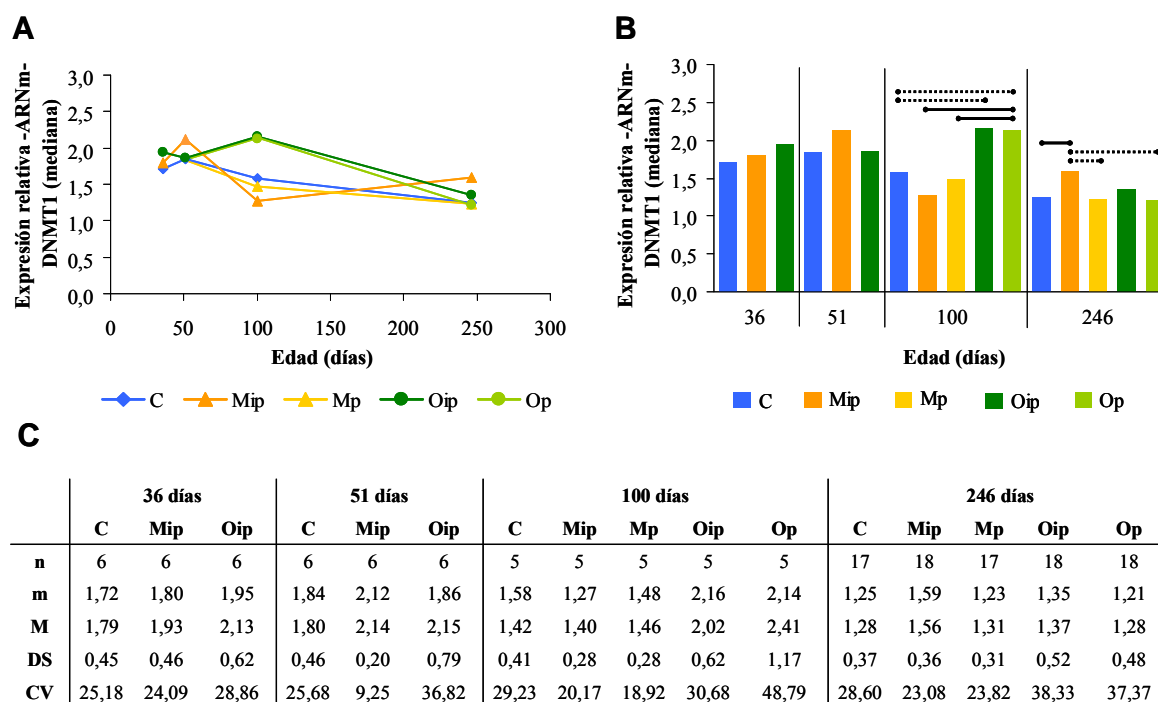


Figura 71. Expresión relativa del ARNm de DNMT1 en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Niveles de ARNm de DNMT1 en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Por lo que respecta a **DNMT3a** en glándula mamaria, los resultados obtenidos mostraron un claro y potente ascenso en los niveles de expresión de este enzima a 51 días de edad en todos los grupos experimentales, presentando el grupo Mip los mayores niveles. En relación a la dieta, a 100 días de edad el grupo Op mostró niveles de expresión de DNMT3a superiores al grupo control y a ambos grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Al final del ensayo, únicamente se detectó una tendencia a la disminución en Oip en comparación con Mip (Figura 72).

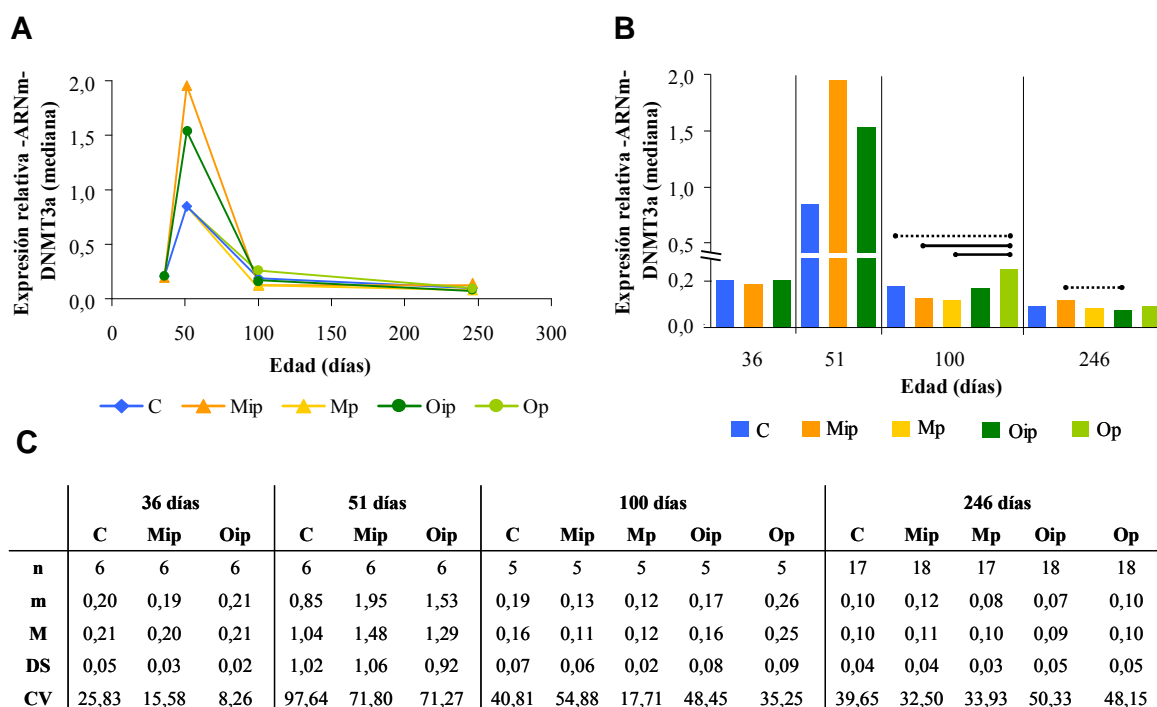


Figura 72. Expresión relativa del ARNm de DNMT3a en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Niveles de ARNm de DNMT3a en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

En cuanto a la expresión de **DNMT3b** en glándula mamaria, se observó en general un ligero descenso de los niveles de ARNm de dicha enzima hacia el final del ensayo (246 días) en todos los grupos experimentales (Figura 73-A). Tal y como sucedía con DNMT1 y DNMT3a, a 36 y 51 días de edad no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, el grupo Op incrementó los niveles de DNMT3b a 100 días de edad en comparación con Mip. Al final del ensayo los valores de Oip fueron inferiores a los detectados en el grupo control y en ambos grupos de dieta hiperlipídica de aceite de maíz (Figura 73-B).

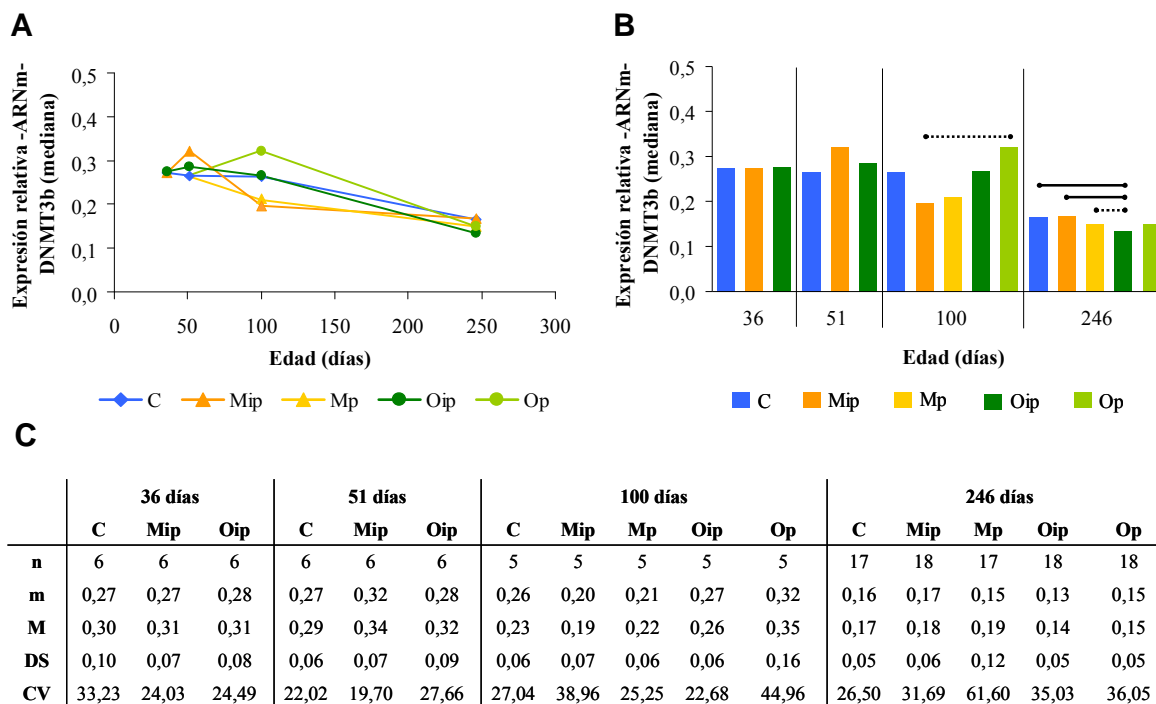


Figura 73. Expresión relativa del ARNm de DNMT3b en glándula mamaria de los grupos experimentales a diferentes edades. Niveles de ARNm de DNMT3b en función de la edad (A) y de la dieta (B). (C) Estadística descriptiva (n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%)). A los 36 y 51 días de edad, la condición control (dieta normolipídica) corresponde a los grupos C+Mp+Op. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Expresión de ADN metiltransferasas en adenocarcinomas mamarios

El estudio de los niveles de expresión génica de DNMT1 (Figura 74-A) y DNMT3a (Figura 74-B) en adenocarcinomas mamarios no reveló diferencias significativas entre grupos experimentales, a excepción del descenso (cercano a la significación) detectado en los niveles de DNMT3a en los grupos de dieta de aceite de oliva respecto al control, y de Oip en comparación con Mip. Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de DNMT3b en los grupos de dietas hiperlipídicas, de forma significativa en Mip, Oip y Op, presentando el grupo Oip, además, una menor expresión de DNMT3b que Mp (Figura 74-C).

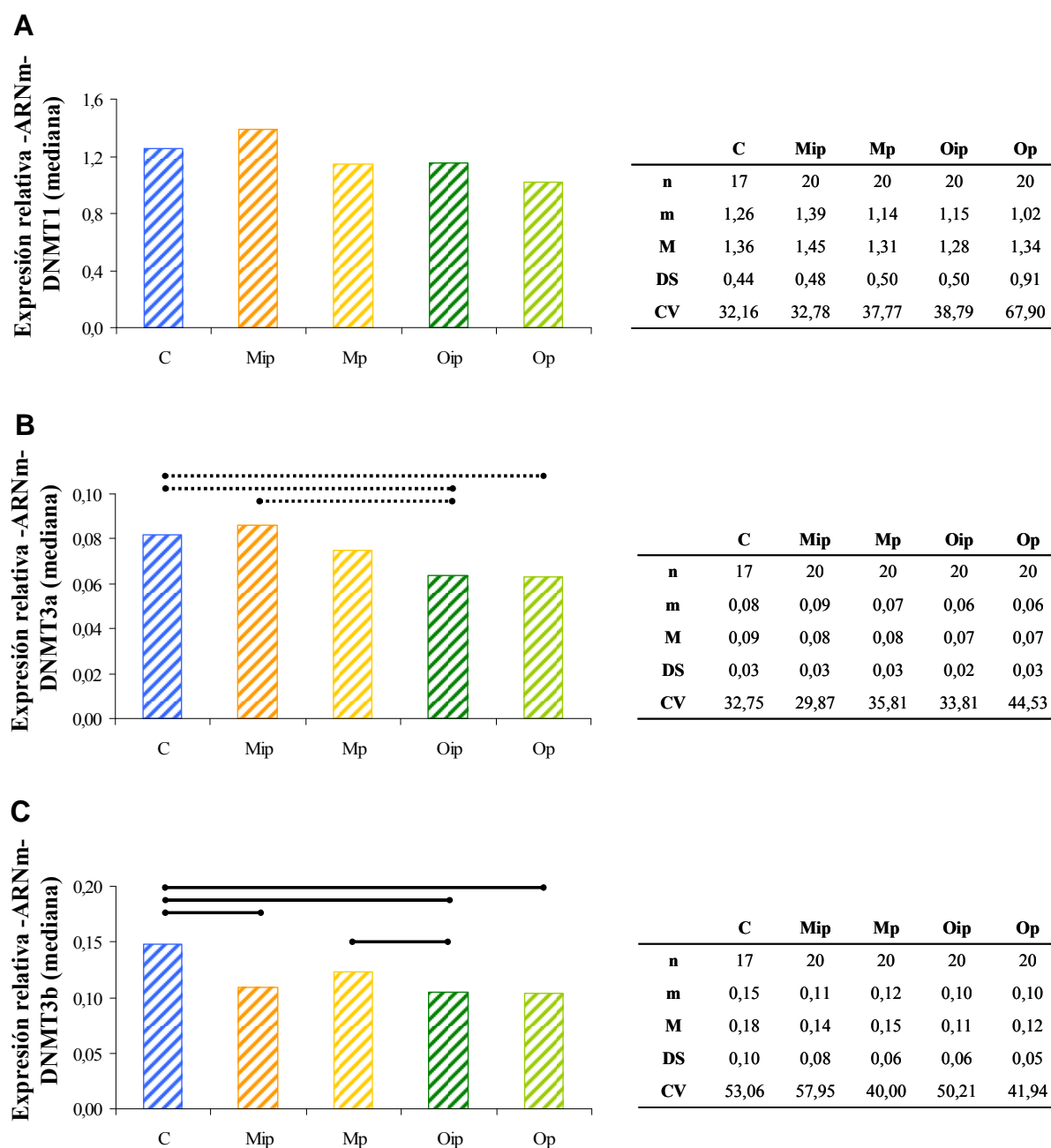


Figura 74. Expresión relativa del ARNm de DNMT1 (A), DNMT3a (B) y DNMT3b (C) en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Comparación de la expresión de ADN metiltransferasas entre ambos tejidos

Los resultados obtenidos en glándula mamaria y adenocarcinomas mostraron que la ADN metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1) fue la más expresada en ambos tejidos y en todos los grupos experimentales, en comparación con las isoformas responsables de la

metilación “de novo” (DNMT3a y DNMT3b). Por otro lado, en todos los grupos experimentales los niveles de expresión de DNMT1, DNMT3a y DNMT3b fueron siempre superiores en glándula mamaria en relación a los adenocarcinomas, presentando significación estadística, en general, en DNMT3a y DNMT3b en los grupos de dieta hiperlipídica (Figura 75).

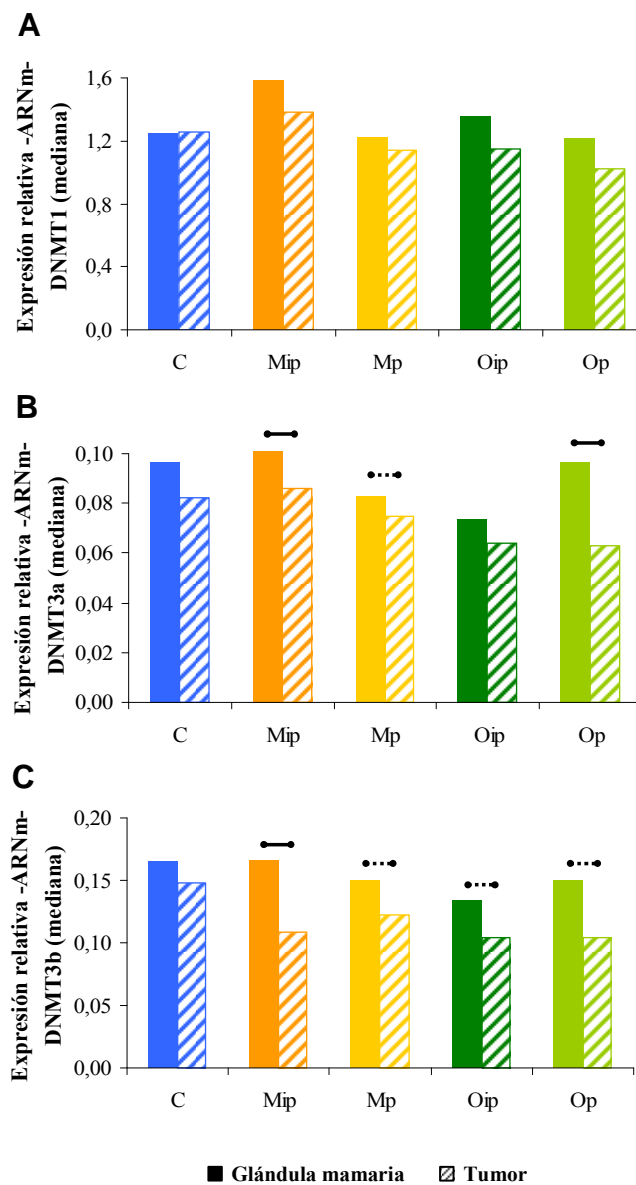


Figura 75. Comparación de los niveles de expresión relativa del ARNm de DNMT1 (A), DNMT3a (B) y DNMT3b (C) en glándula mamaria y adenocarcinomas al final del ensayo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

2.3.2 Actividad ADN metiltransferasa total

En **glándula mamaria** los grupos de dietas hiperlipídicas, en general, presentaron niveles superiores de actividad ADN metiltransferasa respecto al control, de forma significativa para Mip y Oip, y cercana a la significación en Mp. No obstante, fue el grupo Mip el que destacó por mostrar los valores más altos de actividad en comparación con el resto. Por otro lado, los grupos alimentados con dietas hiperlipídicas desde el destete (Mip y Oip) presentaron mayor grado de actividad enzimática que Mp y Op, respectivamente. (Figura 76).

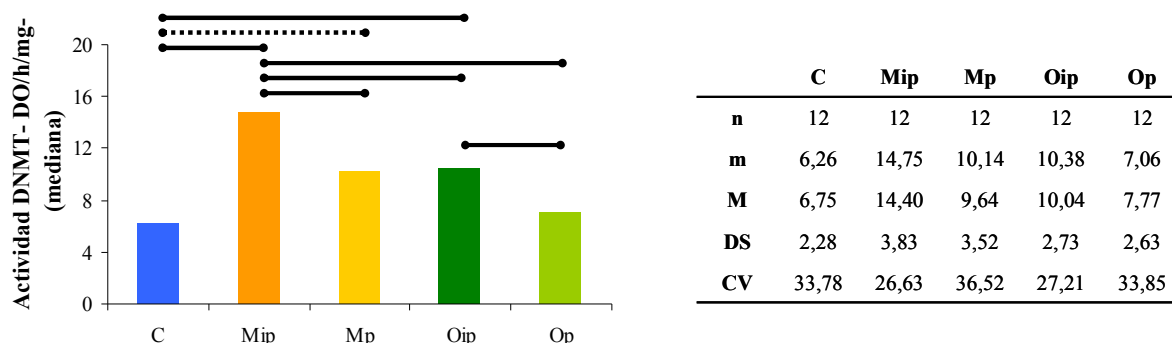


Figura 76. Niveles de actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria de los grupos experimentales al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

En **adenocarcinomas mamarios**, tal y como sucedía en glándula mamaria, el grupo Mip fue el que presentó de forma significativa los mayores niveles de actividad ADN metiltransferasa respecto al resto de grupos. Además, se halló una mayor actividad en Oip en comparación con Op (Figura 77).

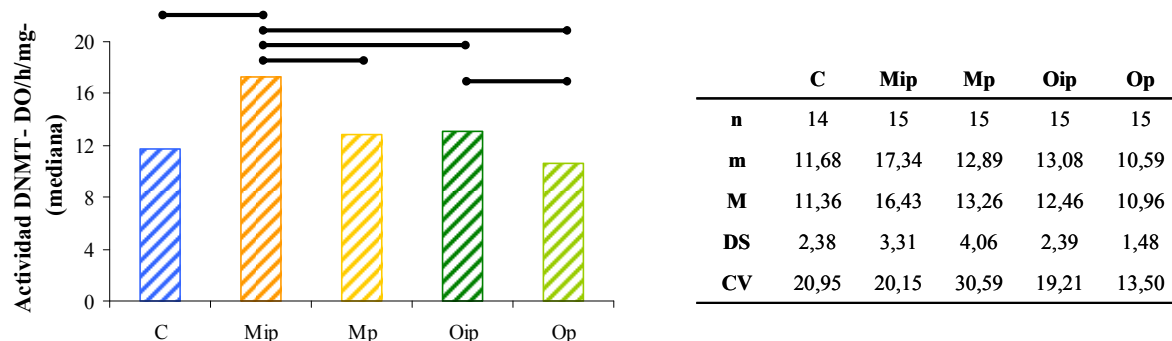


Figura 77. Niveles de actividad ADN metiltransferasa en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo. n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La **comparación entre ambos tejidos** mostró un incremento en el grado de actividad ADN metiltransferasa en tumor, de forma significativa en todos los grupos excepto en Mip (Figura 78).

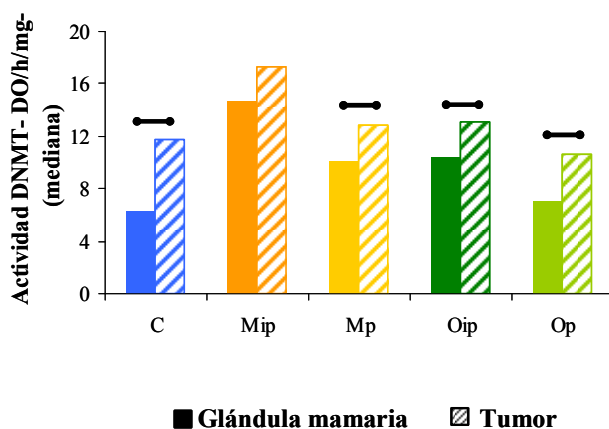


Figura 78. Comparación de los niveles de actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria y adenocarcinomas de los grupos experimentales al final del ensayo. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS

Con el fin de evaluar otro mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica a parte de la metilación del ADN, se determinaron los niveles de modificaciones postraduccionales de la histona 3 (H3K4me2 y H3K27me3) y de la histona 4 (H4K20me3 y H4K16ac) por Western Blot (Figura 79).

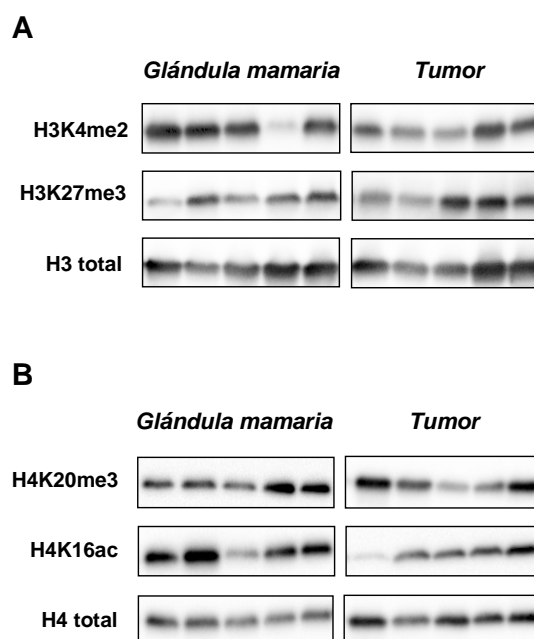


Figura 79. Imagen representativa de la detección por Western Blot de las modificaciones postraduccionales de histonas. (A) Detección de los niveles globales de las modificaciones de la histona 3 (H3K4me2 y H3K27me3) así como de histona 3 total (H3) en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo. **(B)** Detección de los niveles globales de las modificaciones de la histona 4 (H4K20me3 y H4K16ac) así como de histona 4 total (H4) en glándula mamaria y adenocarcinomas mamarios al final del ensayo.

Modificaciones postraduccionales de histonas en glándula mamaria

Por lo que respecta a las modificaciones de la histona 3, los resultados obtenidos en el análisis de los niveles de H3K4me2 no mostraron diferencias significativas entre grupos, pese a que Mp y Op obtuvieron los valores globales más elevados (Figura 80-A). Sin embargo, se observó una disminución significativa en los niveles de H3K27me3 en Mip respecto al control (Figura 80-B).

En cuanto a las modificaciones de la histona 4, el grupo Oip fue el que presentó mayores niveles de H4K20me3 respecto a todos los grupos, pero estas diferencias no obtuvieron relevancia estadística (Figura 80-C). Por último, se observó una disminución cercana a la significación en los niveles de H4K16ac en Oip en comparación con el control y con Op (Figura 80-D).

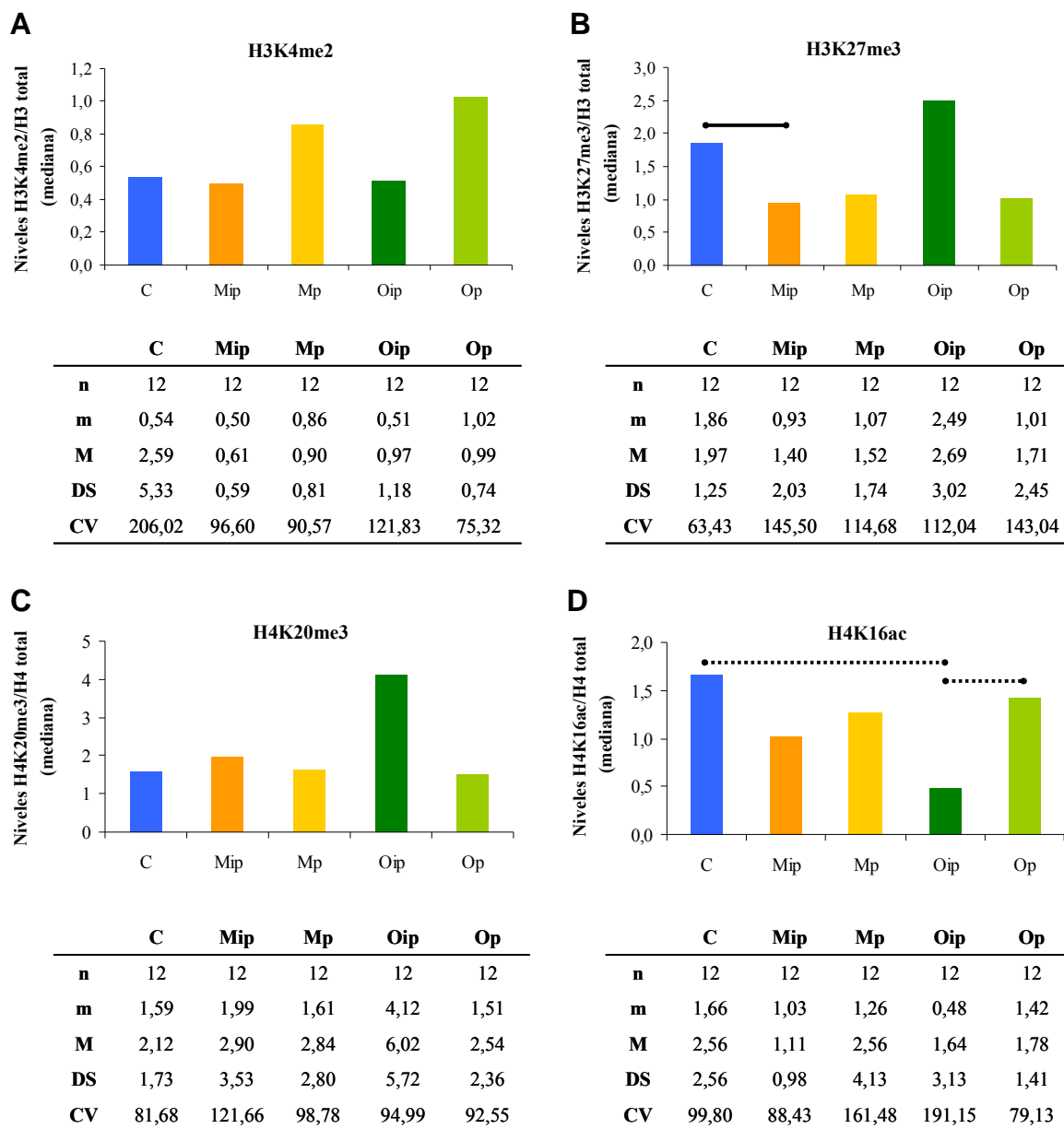


Figura 80. Niveles relativos de modificaciones postraduccionales de histonas en glándula mamaria de los grupos experimentales al final del ensayo. Niveles de H3K4me2 (A) y H3K27me3 (B) respecto a los niveles de histona 3 total. Niveles de H4K20me3 (C) y H4K16ac (D) respecto a los niveles de histona 4 total. H3: histona 3, H4: histona 4, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Modificaciones postraduccionales de histonas en adenocarcinomas mamarios

En adenocarcinomas no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales para ninguna de las modificaciones de la histona 3 estudiadas (H3K4me2 y H3K27me3) (Figura 81-A y 81-B respectivamente).

Por otro lado, los resultados obtenidos en las modificaciones de la histona 4 mostraron una disminución en los niveles de H4K20me3 en Op respecto al resto de grupos experimentales. Además, Oip obtuvo valores menores que Mip de forma cercana a la significación (Figura 81-C). En el caso de H4K16ac, únicamente se obtuvo una disminución significativa en Op respecto Oip (Figura 81-D).

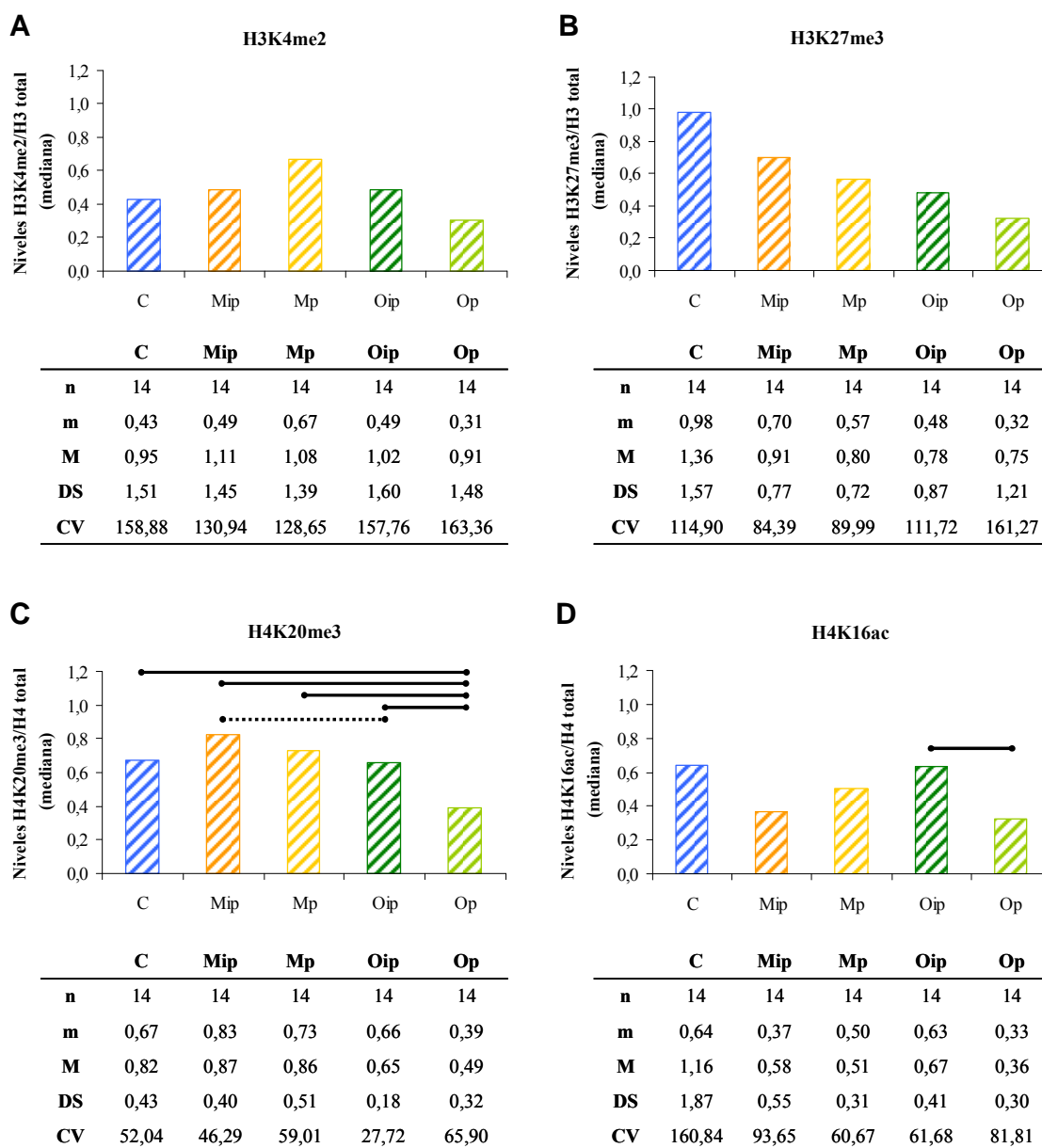


Figura 81. Niveles relativos de modificaciones postraduccionales de histonas en adenocarcinomas mamarios de los grupos experimentales al final del ensayo. Niveles de H3K4me2 (A) y H3K27me3 (B) respecto a los niveles de histona 3 total. Niveles de H4K20me3 (C) y H4K16ac (D) respecto a los niveles de histona 4 total. H3: histona 3, H4: histona 4, n: tamaño muestral, m: mediana, M: media, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%). Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

Comparación de las modificaciones postraduccionales de histonas entre ambos tejidos

Los niveles globales de las modificaciones de la histona 3 (H3K4me2 y H3K27me3) y de la histona 4 (H4K20me3 y H4K16ac) fueron inferiores en adenocarcinomas respecto a glándula mamaria, siendo tales diferencias estadísticamente relevantes para H3K27me3 (grupos control, Oip y Op), H4K20me3 (todos los grupos) y H4K16ac (grupos control y Op) (Figura 82).

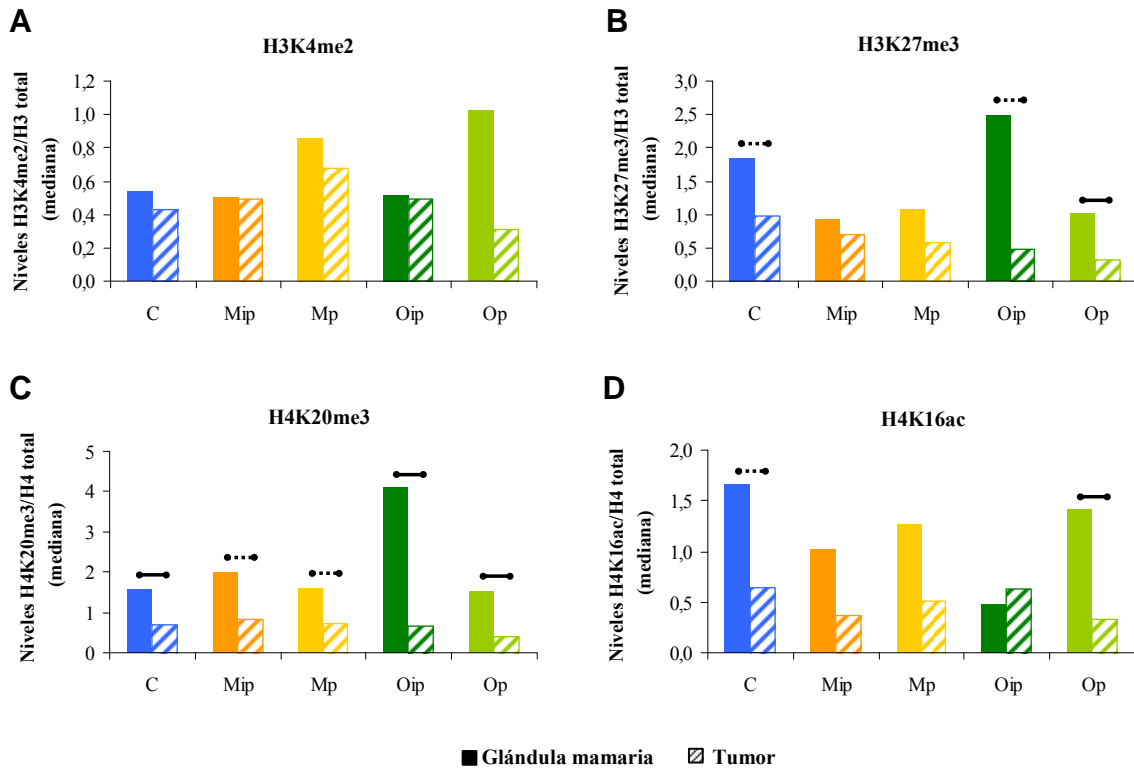


Figura 82. Comparación de los niveles relativos de modificaciones postraduccionales de histonas en glándula mamaria y adenocarcinomas de los grupos experimentales al final del ensayo. H3: histona 3, H4: histona 4. Las comparaciones con línea continua indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y las comparaciones con línea discontinua indican diferencias cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$).

4. CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL MODELO EXPERIMENTAL

Para evaluar la interacción de los mecanismos epigenéticos estudiados (metilación del ADN y modificación postraduccionales de histonas) entre sí y sobre la regulación de la expresión génica, se realizaron correlaciones de los datos moleculares obtenidos al final del ensayo en glándula mamaria y tumor en los diferentes estudios en función del grupo

experimental, así como independientemente del grupo (considerando los valores de todos ellos). Además, en el caso de los datos de los adenocarcinomas mamarios, éstos fueron a su vez correlacionados con parámetros clínicos e histopatológicos.

En primer lugar, se correlacionó la expresión de los genes supresores tumorales RASSF1A y TIMP3 con el grado de metilación de sus regiones promotoras. Así, la expresión génica de RASSF1A correlacionó negativamente con el grado de metilación de dicho gen en glándula mamaria en el grupo Mip ($\rho=-0,565$; $p=0,035$), mientras que la expresión del gen TIMP3 correlacionó positivamente con el grado de metilación de su región promotora en tumor en el grupo control ($\rho=0,698$; $p=0,008$). Al unificar todos los grupos (Tablas 29 y 30), no se obtuvieron correlaciones significativas entre el grado de metilación de RASSF1A y TIMP3 y sus valores de expresión génica respectivamente. Por otro lado, tanto en glándula mamaria como en tejido tumoral se hallaron correlaciones positivas en las comparaciones de la expresión de los genes supresores tumorales (RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c) entre sí. Además, en ambos tejidos el grado de metilación génica de RASSF1A y el de TIMP3 mostró una correlación positiva (Tablas 29 y 30).

Se correlacionaron también los datos de expresión génica de las ADN metiltransferasas y su actividad enzimática total. En este sentido, sólo se observaron correlaciones significativas entre los niveles de ARNm de las isoformas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b y la actividad enzimática ADN metiltransferasa en el grupo Op. Dicho grupo mostró correlaciones positivas entre la expresión génica de DNMT3b y la actividad DNMT global tanto en glándula mamaria ($\rho=0,736$; $p=0,009$) como en tumor ($\rho=0,769$; $p=0,003$), así como una asociación negativa entre la expresión de DNMT3a y la actividad DNMT en glándula mamaria ($\rho=-0,600$; $p=0,051$). Al unificar los grupos experimentales (Tablas 29 y 30), tanto en glándula mamaria como en tumor, las expresiones de las tres isoformas de ADN metiltransferasas correlacionaron positivamente entre sí, aunque no se hallaron correlaciones significativas entre expresión y actividad enzimática global.

Por su parte, la actividad enzimática ADN metiltransferasa total fue correlacionada también con la metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3. En glándula mamaria se hallaron correlaciones positivas entre la actividad DNMT global y los niveles de metilación de RASSF1A en los grupos Mip ($\rho=0,545$; $p=0,083$) y Mp ($\rho=0,700$; $p=0,016$), así como con el grado de metilación del gen TIMP3 en Mip ($\rho=0,555$; $p=0,076$). En tejido tumoral, la actividad DNMT también correlacionó positivamente con el grado de metilación de TIMP3 en Mip ($\rho=0,574$; $p=0,032$). En el caso del análisis realizado unificando los distintos grupos (Tablas 29 y 30), no se hallaron correlaciones con relevancia estadística.

En relación a las modificaciones postraduccionales de las histonas, en general, no se hallaron correlaciones significativas entre los niveles globales de H3K4me2, H3K27me3, H4K20me3 y H4K16ac y la expresión génica de RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c. Pese a ello, al unificar los grupos experimentales (Tablas 29 y 30), en glándula mamaria los niveles de H3K27me3 y de H4K16ac correlacionaron positivamente con la expresión génica de TIMP3 y RASSF1A, respectivamente. En adenocarcinomas mamarios, los niveles globales de H4K20me3 correlacionaron positivamente con la expresión de los genes supresores tumorales (RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c), y los de H4K16ac de forma negativa con la expresión génica de CDKN2c. Por otro lado, se hallaron correlaciones positivas entre las dos modificaciones de la histona 4 (H4K20me3 y H4K16ac) en glándula mamaria, así como entre las modificaciones de la histona 3 (H3K4me2 y H3K27me3) en tejido tumoral.

Finalmente, los parámetros histopatológicos (grado arquitectural, grado nuclear, mitosis, mitosis score, SBR11 y SBR3), así como el dato clínico de volumen tumoral, se correlacionaron con los datos moleculares obtenidos en los tumores. En la Tabla 31 se muestran específicamente los análisis de correlación realizados por grupo experimental con los datos de actividad enzimática ADN metiltransferasa, metilación global del genoma y niveles totales de H4K20me3, dada la posible implicación de estos mecanismos en los efectos que las dietas experimentales ejercen sobre la carcinogénesis mamaria. En este sentido, la actividad enzimática DNMT en los adenocarcinomas del grupo control correlacionó positivamente con el grado arquitectural y los índices SBR11 y SBR3. En cuanto a la metilación global del genoma, ésta correlacionó de forma negativa en el grupo Mp con el grado arquitectural, número de mitosis e índice SBR11, y de manera positiva en los grupos alimentados con aceite de oliva con el grado arquitectural (Op) y nuclear (Oip y Op). Además, los niveles globales de H4K20me3 correlacionaron negativamente con varios parámetros histopatológicos de los tumores en los grupos de dietas hiperlipídicas. Por otro lado, se analizaron las correlaciones de todos los datos moleculares con los parámetros clínicos e histopatológicos independientemente del grupo experimental (Tabla 32). Así, dichos parámetros correlacionaron, en general, de forma negativa con los niveles de expresión génica de RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c, y de manera positiva con la expresión de las isoformas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Además, se obtuvo una correlación positiva entre el grado de metilación de RASSF1A y el volumen tumoral, así como una correlación negativa entre los niveles totales de H4K20me3 y el grado arquitectural e índices SBR11 y SBR3.

EXPRESIÓN GÉNICA	EXPRESIÓN GÉNICA			METILACIÓN ADN			METILACIÓN HISTONAS						
	RASSF1A	TIMP3	CDKN2C	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b	RASSF1A	TIMP3	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	H3K4me2	H3K27me3	H4K20me3
EXPRESIÓN GÉNICA													
TIMP3	rho n	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,016**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CDKN2C	rho n	0,220 87	0,185 87	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,041**	0,085*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT1	rho n	0,180 87	0,125 87	-0,214 87	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,095*	0,046**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT3a	rho n	0,413 87	0,204 87	-0,066 87	0,665 88	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	<0,001**	0,544	—	<0,001**	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT3b	rho n	0,315 87	0,198 87	-0,142 87	0,732 88	0,744 88	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,003**	0,066*	—	<0,001**	<0,001**	—	—	—	—	—	—	—
METILACIÓN ADN													
RASSF1A	rho n	-0,001 73	-0,068 73	-0,097 73	0,192 74	-0,043 74	0,069 74	— —	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,994	0,566	0,415	0,102	0,713	0,557	—	—	—	—	—	—
TIMP3	rho n	0,021 71	-0,117 71	-0,324 71	0,103 72	0,120 72	0,138 72	0,398 75	— —	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,861	0,331	0,006**	0,39	0,314	0,247	<0,001**	—	—	—	—	—
ACTIV. DNMT	rho n	0,074 56	0,073 56	-0,191 56	0,001 57	-0,005 57	0,006 57	0,124 54	0,168 52	— —	— —	— —	— —
	p-value	0,588	0,594	0,159	0,992	0,969	0,967	0,371	0,235	—	—	—	—
MET. GLOBAL	rho n	0,099 86	0,255 86	-0,045 86	0,057 87	0,116 87	-0,008 87	-0,152 77	-0,183 75	0,048 60	— —	— —	— —
	p-value	0,363	0,018**	0,683	0,602	0,283	0,938	0,187	0,117	0,715	—	—	—
MODIFICACIÓN HISTONAS													
H3K4me2	rho n	-0,040 56	-0,185 56	-0,142 56	0,032 57	0,054 57	0,063 57	-0,109 54	-0,027 52	-0,105 60	-0,022 60	— —	— —
	p-value	0,770	0,172	0,298	0,816	0,690	0,640	0,433	0,849	0,425	0,866	—	—
H3K27me3	rho n	-0,004 56	0,310 56	0,121 56	0,033 57	0,089 57	0,127 57	-0,140 54	-0,138 52	-0,170 60	0,124 60	0,150 60	— —
	p-value	0,978	0,020**	0,373	0,806	0,512	0,348	0,314	0,330	0,193	0,345	0,251	—
H4K20me3	rho n	-0,004 56	0,035 56	-0,104 56	-0,074 57	0,011 57	-0,026 57	0,058 54	-0,079 52	-0,118 60	0,233 60	-0,114 60	0,035 60
	p-value	0,975	0,799	0,445	0,584	0,938	0,848	0,676	0,579	0,370	0,072*	0,385	0,793
H4K16ac	rho n	0,309 56	-0,088 56	0,103 56	-0,09 57	0,006 57	0,059 57	-0,168 54	-0,198 52	-0,193 60	0,045 60	-0,124 60	0,265 60
	p-value	0,020**	0,517	0,451	0,508	0,963	0,661	0,223	0,160	0,139	0,731	0,758	0,041**

Tabla 29. Correlación de los datos moleculares obtenidos en glándula mamaria al final del ensayo. Los análisis de correlación se realizaron independientemente del grupo experimental. (ACTIV. DNMT: Actividad ADN metiltransferasa total, MET. GLOBAL: metilación global, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

EXPRESIÓN GÉNICA	EXPRESIÓN GÉNICA				METILACIÓN ADN				MODIFICACIÓN HISTONAS				
	RASSF1A	TIMP3	CDKN2C	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b	RASSF1A	TIMP3	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	H3K4me2	H3K27me3	H4K20me3
EXPRESIÓN GÉNICA	rho	0,427	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	n	97	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TIMP3	p-value	<0,001**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	rho	0,447	0,261	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CDKN2C	n	97	97	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	<0,001**	0,009**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT1	rho	-0,415	0,018	-0,287	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	n	94	94	94	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT3a	p-value	<0,001**	0,862	0,005**	0,722	—	—	—	—	—	—	—	—
	rho	-0,265	-0,079	-0,389	0,722	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT3b	n	94	94	94	97	—	—	—	—	—	—	—	—
	p-value	0,009**	0,449	<0,001**	<0,001**	0,432	—	—	—	—	—	—	—
METILACIÓN ADN	rho	0,215	0,069	-0,139	0,290	—	—	—	—	—	—	—	—
	n	94	94	94	97	—	—	—	—	—	—	—	—
RASSF1A	p-value	0,037**	0,509	0,183	0,004**	<0,001**	—	—	—	—	—	—	—
	rho	0,027	0,010	0,020	-0,003	-0,100	-0,157	—	—	—	—	—	—
TIMP3	n	68	68	68	70	70	70	—	—	—	—	—	—
	p-value	0,822	0,935	0,868	0,977	0,409	0,194	—	—	—	—	—	—
ACTIV. DNMT	rho	0,247	0,013	0,119	-0,031	-0,106	0,034	0,203	—	—	—	—	—
	n	67	67	67	68	68	68	77	—	—	—	—	—
MET. GLOBAL	p-value	0,044**	0,918	0,338	0,799	0,39	0,783	0,076*	—	—	—	—	—
	rho	0,187	0,048	0,175	-0,005	0,101	0,170	0,167	0,184	—	—	—	—
MODIFICACIÓN HISTONAS	n	59	59	59	60	60	48	48	—	—	—	—	—
	p-value	0,156	0,719	0,185	0,970	0,443	0,195	0,255	0,210	—	—	—	—
H3K4me2	rho	-0,100	-0,010	0,008	0,028	0,072	-0,090	0,149	0,092	0,072	—	—	—
	n	77	77	77	76	76	76	75	77	68	—	—	—
H3K27me3	p-value	0,387	0,932	0,942	0,811	0,539	0,441	0,203	0,424	0,561	—	—	—
	rho	0,192	0,047	0,093	-0,073	0,004	-0,181	0,083	0,116	-0,087	—	—	—
H4K20me3	n	57	57	57	58	58	58	57	59	70	—	—	—
	p-value	0,153	0,730	0,492	0,586	0,975	0,174	0,537	0,384	0,476	—	—	—
H4K16ac	rho	-0,111	0,003	0,026	0,178	0,080	-0,091	0,142	0,030	-0,081	0,972	0,541	—
	n	57	57	57	58	58	58	57	59	70	65	70	—
H3K4me2	p-value	0,413	0,984	0,848	0,182	0,550	0,495	0,293	0,822	0,505	0,825	<0,001**	—
	rho	0,230	0,291	0,434	-0,184	-0,236	-0,015	-0,050	0,118	0,033	0,083	-0,062	0,196
H4K20me3	n	56	56	56	57	57	57	57	58	64	64	69	69
	p-value	0,088*	0,029**	<0,001**	0,171	0,077*	0,912	0,714	0,379	0,786	0,514	0,612	0,107
H4K16ac	rho	-0,015	0,024	-0,258	0,117	0,344	0,247	-0,147	0,047	0,082	0,058	-0,026	0,129
	n	56	56	56	57	57	57	57	58	64	64	69	69
H4K20me3	p-value	0,913	0,861	0,055*	0,385	0,009**	0,064*	0,276	0,728	0,739	0,639	0,835	0,290
	rho	0,192	0,047	0,093	-0,073	0,004	-0,181	0,083	0,116	-0,087	-0,005	0,612	0,107

Tabla 30. Correlación de los datos moleculares obtenidos en adenocarcinomas mamaros al final del ensayo. Los análisis de correlación se realizaron independientemente del grupo experimental. (ACTIV. DNMT: Actividad ADN metiltransferasa total, MET. GLOBAL: metilación global, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, p-value: significación estadística). **: correlaciones significativas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

	C		Mip		Mp		Oip		Op	
	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL
PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS										
GRADO ARQUITECTURAL										
rho	0,594	0,211	-0,238	-0,322	-0,541	-0,438	0,222	-0,114	-0,056	-0,440
n	14	14	15	21	14	21	14	20	15	14
<i>p-value</i>	0,025**	0,470	0,392	0,154	0,045**	0,047**	0,446	0,632	0,843	0,038**
GRADO NUCLEAR										
rho	-0,440	-0,140	0,277	0,158	-0,094	-0,313	-0,180	0,396	0,175	0,533
n	14	14	15	21	14	21	14	20	15	20
<i>p-value</i>	0,116	0,633	0,317	0,494	0,750	0,167	0,538	0,084*	0,533	0,015**
rho	-0,423	-0,119	0,040	0,049	0,000	-0,084	-0,097	0,223	0,177	-0,134
n	14	14	15	21	14	21	14	20	15	20
<i>p-value</i>	0,132	0,685	0,888	0,833	1,000	0,081*	0,741	0,345	0,527	0,891
MITOSIS										
rho	-0,448	-0,158	0,049	0,068	-0,123	-0,119	-0,098	0,208	0,090	0,070
n	14	14	15	21	14	21	14	20	15	20
<i>p-value</i>	0,108	0,590	0,862	0,770	0,676	0,173	0,738	0,380	0,750	0,769
MITOSIS SCORE										
rho	0,471	-0,092	0,061	-0,092	-0,195	-0,464	-0,016	0,196	0,118	-0,354
n	14	14	15	21	14	21	14	20	15	20
<i>p-value</i>	0,088*	0,754	0,829	0,693	0,504	0,034**	0,957	0,408	0,677	0,113
SBR11										
rho	0,650	0,081	0,040	-0,034	-0,299	-0,365	-0,101	0,180	0,109	0,313
n	14	14	15	21	14	21	14	20	15	20
<i>p-value</i>	0,012**	0,784	0,888	0,882	0,299	0,104	0,730	0,447	0,698	0,178
SBR3										
rho	-0,042	-0,389	0,093	-0,166	-0,495	0,247	-0,386	-0,251	0,129	-0,209
n	14	14	15	21	14	21	15	20	15	20
<i>p-value</i>	0,887	0,169	0,742	0,471	0,072*	0,279	0,156	0,286	0,648	0,135
VOLUMEN TUMORAL										
rho										
<i>p-value</i>										

Tabla 31. Correlación de los datos moleculares y los parámetros clínicos e histopatológicos de los adenocarcinomas en los diferentes grupos experimentales al final del ensayo. (ACTIV. DNMT: Actividad ADN metiltransferasa total, MET. GLOBAL: metilación global, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, *p-value*: significación estadística). **: correlaciones estadísticas (p<0,05), *: correlaciones cercanas a la significación (0,05<p<0,1). En verde se indican las correlaciones positivas con p<0,1 y en rojo las negativas.

	EXPRESIÓN GÉNICA						METILACIÓN ADN			MODIFICACIÓN HISTONAS				
	RASSF1A	TIMP3	CDKN2C	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b	RASSF1A	TIMP3	ACTIV. DNMT	MET. GLOBAL	H3K4me2	H3K27me3	H4K20me3	H4K16ac
PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS														
GRADO ARQUITECTURAL	rho	-0,158	-0,238	0,096	0,296	-0,089	-0,135	-0,148	-0,117	-0,064	0,083	-0,100	-0,249	0,174
	n	84	84	84	84	84	82	81	73	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,510	0,029**	0,386	0,006**	0,423	0,225	0,187	0,326	0,538	0,495	0,410	0,039**	0,153
GRADO NUCLEAR	rho	-0,097	-0,352	0,303	0,406	0,238	0,013	0,003	0,095	0,067	0,123	-0,052	-0,161	0,101
	n	84	84	84	84	84	82	81	73	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,379	0,074*	0,001**	<0,001**	0,029**	0,906	0,981	0,422	0,517	0,312	0,669	0,186	0,409
MITOSIS	rho	-0,164	-0,186	0,354	0,44	0,348	-0,147	0,05	0,014	-0,056	-0,082	-0,083	-0,183	0,112
	n	84	84	84	84	84	82	81	73	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,136	0,090*	0,016**	<0,001**	0,001**	0,188	0,660	0,908	0,587	0,501	0,493	0,133	0,361
MITOSIS SCORE	rho	-0,177	-0,169	0,351	0,443	0,334	-0,097	0,07	-0,007	-0,035	-0,091	-0,042	-0,197	0,079
	n	84	84	84	84	84	82	81	73	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,107	0,125	0,009**	0,001**	0,001**	0,388	0,532	0,956	0,735	0,454	0,732	0,104	0,521
SBR11	rho	-0,145	-0,195	0,304	0,454	0,234	-0,108	-0,003	0,009	-0,014	0,014	-0,064	-0,219	0,127
	n	84	84	84	84	84	82	81	73	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,19	0,075*	0,002**	<0,001**	0,032**	0,336	0,979	0,942	0,889	0,91	0,598	0,070*	0,297
SBR3	rho	-0,101	-0,182	0,196	0,390	0,191	-0,105	-0,027	0,029	0,014	0,002	-0,09	-0,214	0,110
	n	84	84	84	84	84	82	81	73	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,36	0,096*	0,018**	0,074*	0,081*	0,347	0,81	0,805	0,892	0,985	0,459	0,077*	0,367
VOLUMEN TUMORAL	rho	-0,196	-0,190	0,345	0,253	-0,033	0,194	0,002	-0,029	-0,003	-0,01	-0,021	-0,154	-0,146
	n	84	84	84	84	84	83	82	74	96	70	70	69	69
	<i>p-value</i>	0,071*	0,080*	0,001**	0,019**	0,763	0,078*	0,984	0,806	0,974	0,935	0,863	0,207	0,232

Tabla 32. Correlación de los datos moleculares y los parámetros clínicos e histopatológicos de los adenocarcinomas al final del ensayo. Los análisis de correlación se realizaron independientemente del grupo experimental. (ACTIV. DNMT: Actividad ADN metiltransferasa total, MET. GLOBAL: metilación global, rho: coeficiente de correlación de Spearman, n: tamaño muestral, *p-value*: significación estadística). **: correlaciones significativas ($p < 0,05$), *: correlaciones cercanas a la significación ($0,05 < p < 0,1$). En verde se indican las correlaciones positivas con $p < 0,1$ y en rojo las negativas.

..... **DISCUSIÓN** ■

A. ESTUDIO EN HUMANOS

Este estudio se basa en un proyecto multicéntrico actualmente en curso y realizado en colaboración con dos centros hospitalarios, el Servicio de Oncología Médica del Instituto de Oncología Corachan (IDOC) de Barcelona y el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Consorcio Sanitario de Tarrasa (CST). Dicho proyecto está actualmente en marcha y cuenta hasta la fecha con un total de 152 participantes, concretamente 63 mujeres sanas y 89 pacientes con cáncer de mama. Pese a que el tamaño muestral es reducido para tratarse de un estudio en humanos ([8710], [8711], [8712]) y en vista de ser ampliado, en este trabajo se han presentado los resultados obtenidos hasta el momento.

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y ANTROPOMÉTRICOS

Los resultados obtenidos con los datos disponibles hasta la fecha ponen de manifiesto que las poblaciones (sanas y enfermas de cáncer de mama) no son homogéneas, debido fundamentalmente a la diferencia de edad hallada entre ambas cohortes. Por lo que respecta a los **parámetros reproductivos**, y probablemente relacionado con esta diferencia de edad y con el número de participantes, el estado ovárico también presenta diferencias significativas entre las poblaciones, correspondiendo en su mayoría las voluntarias sanas a mujeres premenopáusicas y las enfermas a postmenopáusicas. Por otro lado, diversos parámetros asociados a la reproducción han sido relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, tales como la nuliparidad, una primera gestación tardía, la menarquia precoz y la menopausia tardía ([3950], [3966], [5975]). Sin embargo, en el presente trabajo no se obtuvieron diferencias significativas entre la población de sanas y enfermas en relación a la edad de aparición de la menarquia y de la menopausia, el número de embarazos y la edad en la primera gestación. Contrariamente, existen evidencias epidemiológicas sobre el papel protector de la lactancia contra el desarrollo de cáncer de mama tanto en mujeres pre- como postmenopáusicas ([6093]). En este sentido, tampoco se hallaron diferencias con relevancia estadística entre poblaciones en cuanto a la práctica de lactancia materna.

Existen una serie de **parámetros antropométricos** asociados positivamente con el riesgo de cáncer de mama, tales como el índice de masa corporal (IMC) y la ratio cintura-cadera ([6093]). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre poblaciones para ambos

parámetros, observándose en enfermas valores superiores de IMC y de ratio cintura-cadera y, por tanto, una mayor corpulencia y adiposidad abdominal. Estas diferencias también estarían relacionadas con la diferencia de edad hallada entre las dos poblaciones ya que es un hecho conocido el aumento de la cantidad de grasa y la variación de su distribución corporal con la edad ([8713]). Pese a que no se puede establecer una relación causa-efecto al tratarse de un estudio caso-control, tampoco se puede descartar la influencia del proceso carcinogénico mamario en las diferencias observadas para ambos parámetros antropométricos.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO: ESTILO DE VIDA

En cuanto a la **caracterización del estilo de vida**, se evaluaron los hábitos dietéticos y otros factores como el hábito tabáquico, el consumo de alcohol y la realización de actividad física en ambas poblaciones. En relación a estos últimos parámetros, el hábito tabáquico se registró de forma categórica en la historia clínica, mientras que el consumo de alcohol se cuantificó a partir de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos. En cuanto a la actividad física, se empleó un cuestionario de frecuencia de práctica de actividades basado en el utilizado en el Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study ([7300], [7319]), cuya versión española fue previamente validada ([7320]). Diversos estudios epidemiológicos han mostrado asociaciones positivas entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, mientras que la realización de ejercicio físico ejercería un efecto protector. El hábito tabáquico, factor de riesgo en otros tipos de cánceres, ha mostrado resultados inconsistentes en cáncer de mama ([6093]). Sin embargo, en este trabajo el consumo de tabaco no fue un hábito diferencial entre poblaciones, a diferencia de la mayor ingesta de alcohol y realización de actividad física hallada en las mujeres sanas. En cuanto a la ingesta de alcohol, los estudios epidemiológicos establecen como consumo moderado de alcohol entre 10-50 g/día en hombres y 5-25 g/día en mujeres ([8789], [8790]). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que, pese a que la ingesta fue superior en mujeres sanas (2,15 g/día) en relación a las enfermas (1,42 g/día), las participantes de ambas poblaciones mostraron un bajo consumo de alcohol. Por lo que respecta a la realización de actividad física, las voluntarias sanas presentaron un nivel de actividad física bajo (15,12 MET/semana), mientras que en la población de enfermas dicho nivel fue moderado (23,68 MET/semana) ([8788]). Así, las diferencias halladas entre ambas poblaciones en cuanto al consumo de alcohol y la realización de ejercicio físico podrían reflejar la influencia de la edad

en el estilo de vida de la población, aunque tampoco se puede descartar una influencia de la enfermedad en la realización de actividad física. Además, el menor gasto energético detectado en enfermas podría estar relacionado, al menos en parte, con el aumento de los parámetros antropométricos de IMC y ratio cintura-cadera hallado en estas mujeres.

Por lo que respecta a la **caracterización de los hábitos dietéticos**, ésta se basó en la evaluación tanto de la adherencia a la Dieta Mediterránea como de la ingesta dietética.

En cuanto a la adherencia a la Dieta Mediterránea, ésta fue evaluada mediante un cuestionario de 14 preguntas, en el que cada una de ellas tomó valores de 0 ó 1 obteniéndose, por tanto, una variable categórica entre 0 y 14 ([7315], [7323]). Otros trabajos han considerado una alta adherencia a la Dieta Mediterránea a las puntuaciones iguales o superiores a 9 ([8715], [8716]). Este cuestionario también se emplea en el estudio prospectivo PREDIMED (“PREvención con DIeta MEDiterránea”) ([8796]) así como en el estudio de intervención dietética CORDIOPREV ([8791]), cuyos resultados muestran que la Dieta Mediterránea reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular. En cuanto al cáncer, diversos estudios epidemiológicos han asociado la adherencia a la Dieta Mediterránea a una menor incidencia de diversos tipos de neoplasias, incluida la de mama ([6051], [7103], [8350], [8792], [8793], [8794]). Los resultados obtenidos en el presente estudio no mostraron diferencias entre las voluntarias sanas y las enfermas en relación al grado de adherencia a la Dieta Mediterránea, presentando las participantes de ambas poblaciones una adherencia media (puntuaciones equivalentes a 8) a dicho patrón dietético. Pese a que se ha descrito una tendencia fundamentalmente en individuos jóvenes hacia la pérdida de adherencia a la Dieta Mediterránea ([8795]), los datos obtenidos sugieren que la magnitud de la diferencia de edad hallada entre poblaciones no fue tan grande como para modificar de forma relevante el grado de adherencia a dicha dieta. En cualquier caso, los resultados de este estudio reflejarían la necesidad de mejorar los patrones alimenticios de la población en general, dado el efecto beneficioso sobre la salud atribuido a la Dieta Mediterránea ([6051], [7103], [8350], [8792], [8793], [8794]).

Por lo que respecta a la evaluación de la ingesta dietética, cabe decir que existen diversos métodos de estimación, tales como el recordatorio de 24 horas, el diario dietético, la historia dietética y el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos ([8714]). Tanto el recordatorio de 24 horas como el diario dietético proporcionan información de la ingesta alimentaria durante un corto período de tiempo, correspondiendo a las últimas 24 horas ó entre 1 y 7 días respectivamente. Es por ello que no son considerados buenos estimadores de la dieta habitual de un individuo, siendo el método menos empleado en estudios de carácter epidemiológico. Por el contrario, la historia dietética y el cuestionario de frecuencia de

consumo de alimentos proporcionan una descripción más completa y detallada de la ingesta alimentaria habitual. En este sentido, la historia dietética ha de ser evaluada por un nutricionista, mientras que los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos pueden ser cumplimentados por un entrevistador o por el propio sujeto, siendo éste el método más utilizado en estudios epidemiológicos de cohortes con elevado número de participantes ([8714]).

También se ha de tener en cuenta que todos estos métodos de estimación de la ingesta dietética presentan limitaciones dado que el recordatorio de la dieta en el pasado puede estar sesgado por la dieta actual, sumado a la poca precisión en la estimación y cuantificación de las porciones de alimentos ([8714]). En el caso de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, éstos además han de ser específicos para los hábitos dietéticos de la población a evaluar. Es por ello que Willett en 1990 propuso como criterios para la inclusión de alimentos en dichos cuestionarios que los sujetos de la población en estudio los consumiesen con relativa frecuencia, que éstos tuviesen un contenido importante de los nutrientes de interés, y que existiese una variación interindividual considerable en su consumo ([8728]). Por estos motivos, en el presente trabajo la evaluación de los hábitos dietéticos del último año se realizó mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos previamente validado y adaptado a la Dieta Mediterránea, incluyéndose un total de 137 “ítems” nutricionales y actualizándose las porciones con el fin de mejorar la representación de los alimentos con mayor frecuencia de consumo en España ([3019], [7303]). Estos cuestionarios también se emplean en el estudio prospectivo PREDIMED (“PREvención con DIeta MEDiterránea”) ([7788]) y en el estudio SUN (“Seguimiento Universidad de Navarra”) ([8365]), cuyos resultados muestran los efectos beneficiosos de la Dieta Mediterránea en relación a diversas patologías, incluyendo la enfermedad cardiovascular y la obesidad.

En el presente trabajo, la caracterización de los hábitos dietéticos de las dos poblaciones de estudio utilizando tales cuestionarios no mostró diferencias en cuanto a la ingesta calórica, mientras que se observó una mayor ingesta diaria en enfermas de lípidos totales, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados totales, así como del tipo omega 6 y 3 de origen no marino, aceite de oliva, fibra y vitamina B₉. Esto podría indicar que los hábitos dietéticos difieren entre sanas y enfermas como consecuencia, probablemente, de la diferencia de edad hallada entre las dos poblaciones.

En definitiva, la caracterización de los sujetos de estudio puso de manifiesto la falta de homogeneidad entre poblaciones en cuanto a la variable edad, hallándose consecuentemente diferencias significativas entre sanas y enfermas en otros parámetros asociados a la edad, tales

como el estado ovárico, los parámetros antropométricos de IMC y ratio cintura-cadera, la práctica de actividad física y los hábitos dietéticos. Así, la población de enfermas se caracterizó por ser de edad más avanzada, siendo en su mayoría mujeres postmenopáusicas, por presentar mayor corpulencia y adiposidad abdominal, por consumir más grasas y menos alcohol y por realizar menos actividad física que las mujeres sanas. Sin embargo, la magnitud de la diferencia de edad entre poblaciones no fue tan amplia como para afectar otros factores asociados con el riesgo de cáncer de mama, tales como el grado de adherencia a la Dieta Mediterránea o factores reproductivos (número de embarazos, edad en la primera gestación y práctica de lactancia materna) cambiantes en la sociedad en las últimas décadas.

Perfil de ácidos grasos de la membrana eritrocitaria

Dadas las limitaciones de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos como método de estimación de la ingesta dietética, se determinó también la composición de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos como posible marcador molecular del consumo de lípidos. Existen numerosos estudios basados en la determinación de la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos, esterios de colesterol y triacilglicéridos presentes en el tejido adiposo, eritrocitos, plasma y/o suero, como método objetivo de estimación del consumo de lípidos, así como de validación de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos ([3233], [6230], [6575], [6700], [6702], [4741]). De entre todos los tejidos, el adiposo ha sido considerado el que mejor refleja la ingesta lipídica a largo plazo (1-1,5 años). Sin embargo, la necesidad de disponer de una biopsia de tal tejido reduce la utilización de esta metodología en estudios epidemiológicos. Por otro lado, la determinación de los ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos reflejaría la ingesta lipídica de los últimos 3 meses, mientras que con el empleo de plasma o suero este período se reduciría aún más, reflejando únicamente la ingesta de los últimos días. Por todo ello, en este trabajo se optó por determinar el perfil de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos mediante cromatografía de gases.

Los resultados obtenidos mostraron que los ácidos grasos mayoritarios en las membranas eritrocitarias, en relación al total de analizados, fueron los ácidos palmítico (C16:0, ≈21%), esteárico (C18:0, ≈16%), oleico (c9-C18:1, ≈16%), linoleico (C18:2, ≈9%) y araquidónico (C20:4, ≈14%). Estos porcentajes, así como los obtenidos para el resto de ácidos grasos analizados de forma individual, estarían en concordancia con datos publicados por otros

autores ([6575], [8729]). A su vez, al agrupar los ácidos grasos en función del tipo se observó que aproximadamente el 46% correspondieron a saturados, el 24% a monoinsaturados, el 25% a poliinsaturados del tipo omega 6 y el 5% restante a omega 3, valores también acordes con datos publicados en fuentes bibliográficas ([6575], [8729]). Al comparar entre poblaciones, en las membranas de los eritrocitos de enfermas se detectaron mayores niveles de ácido pentadecanoico (C15:0), palmitoleico (C16:1), eicosadienoico (C20:2), eicosapentanoico (EPA-C20:5), eláidico (t9-C18:1) y vaccénico (c11-C18:1), así como una disminución en los valores de ácidos grasos saturados totales, ácido esteárico (C18:0), lignocérico (C24:0), nervónico (C24:1) y erúxico (C22:1). Estos resultados probablemente serían debidos a la influencia de múltiples factores, tales como los diferentes hábitos dietéticos entre poblaciones en relación al consumo de grasas, el reducido tamaño muestral de ambas cohortes y la posible alteración del metabolismo lipídico durante el proceso carcinogénico mamario. En este sentido, en la membrana de los eritrocitos de pacientes de cáncer de mama, así como de otros tipos de cánceres, se ha observado una reducción en los niveles de ácido esteárico (C18:0) y un incremento en los de ácido oleico (c9-C18:1), postulándose que estos cambios podrían ser debidos a alteraciones en el metabolismo lipídico por efecto del proceso neoplásico ([7321], [8718], [8719]).

A partir de estos resultados se realizaron correlaciones entre la ingesta de lípidos estimada con los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y la determinación de los ácidos grasos de las membranas eritrocitarias en sanas y enfermas. Los datos obtenidos en ambas poblaciones fueron tratados por separado debido a la posible alteración del metabolismo de los ácidos grasos por el proceso carcinogénico mamario ([7321]), hecho que, sumado a la influencia nutricional, podría modificar de forma diferencial el perfil de ácidos grasos de los eritrocitos en la población de enfermas, tal y como se ha comentado previamente. Dado que el tamaño muestral de las poblaciones es reducido en comparación con estudios similares ([6707], [7463], [8725], [8727]), no es de extrañar que la mayoría de correlaciones se hallasen en la población de enfermas, que constaba con un mayor número de participantes.

En cuanto a los **ácidos grasos saturados**, los resultados obtenidos sugieren que los niveles en las membranas eritrocitarias de ácidos grasos saturados totales, ácido esteárico (C18:0), behénico (C22:0), tricosanoico (C23:0) y lignocérico (C24:0) podrían ser considerados marcadores moleculares que reflejarían la ingesta de lípidos totales y de ácidos grasos saturados. Por su parte, los niveles de ácido margárico (C17:0) en las membranas de eritrocitos únicamente correlacionaron con el consumo de saturados. En este sentido, las

asociaciones más robustas halladas en la literatura sobre los ácidos grasos saturados han correlacionado la presencia de ácido margárico (C17:0) y ácido pentadecanoico (C15:0) en suero y tejido adiposo con la ingesta de dicha familia, sintetizados por la flora bacteriana de los rumiantes y presentes en los productos lácteos ([6698], [8721]).

En el caso de los **ácidos grasos monoinsaturados**, los resultados sugieren que en la población sana la cantidad de ácido palmitoleico (C16:1) en las membranas de los eritrocitos podría reflejar la ingesta de lípidos totales y de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados omega 6 y omega 3 (de origen no marino). Contrariamente a lo esperado, en enfermas la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados totales, ácido oleico (c9-C18:1) y vaccénico (c11-C18:1) en eritrocitos correlacionó inversamente con la ingesta de lípidos totales y de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y positivamente con el consumo de poliinsaturados omega 3 marinos. Aunque se desconoce el posible significado de estas correlaciones, es probable que no exista una relación causa-efecto y que estos parámetros covarien asociados a determinados patrones dietéticos. Además, dichos ácidos grasos (ác. oleico y ác. vaccénico) no únicamente provienen de los aportes dietéticos sino que también son sintetizados de forma endógena, hecho que podría estar influyendo en los niveles hallados en membrana. Es por ello que las correlaciones más claras entre la ingesta dietética y los niveles de ácidos grasos en eritrocitos se han descrito en relación a los ácidos grasos poliinsaturados esenciales ([7463], [8724], [8725]). Por otro lado, el consumo de aceite de oliva evaluado a través de los cuestionarios tampoco correlacionó con la presencia en membrana de ninguno de los ácidos grasos monoinsaturados analizados. En este sentido, ha sido descrito que el contenido en ácidos grasos de los alimentos puede variar en función del método de preparación industrial así como de cocinado. Así, mientras algunos estudios han encontrado asociaciones entre la ingesta de aceite de oliva y los niveles de ácido oleico (c9-C18:1) en las membranas eritrocitarias ([6707], [8722], [8723]), otros no han hallado asociaciones significativas ([6628], [8724]). En cualquier caso, nuestros resultados indicarían que la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados en las membranas eritrocitarias no reflejan el consumo de estos lípidos cuantificados a través de los cuestionarios dietéticos.

Respecto a los **poliinsaturados omega 6**, las correlaciones más sólidas descritas en la literatura son entre la ingesta dietética de ácido linoleico (C18:2) evaluada a través de cuestionarios y sus niveles en las membranas eritrocitarias ([7463], [8724], [8725]). Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de dicho ácido graso en las membranas de eritrocitos y la ingesta estimada a partir de los cuestionarios de frecuencia de consumo. Por otro lado, en enfermas los niveles totales de

poliinsaturados omega 6 en dichas membranas correlacionaron positivamente con la ingesta de lípidos totales, de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y de forma negativa con el consumo de omega 3 de origen marino. Además, los resultados obtenidos sugerirían que la cantidad de ácido docosadienoico (C22:2) en las membranas eritrocitarias podría reflejar la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados totales y del tipo omega 6, aunque no se han hallado evidencias en este sentido en la literatura.

En relación a los **poliinsaturados omega 3**, en enfermas la ingesta de ácidos grasos omega 3 de origen marino se asoció con la presencia de ácido eicosapentanoico (EPA-C20:5) en las membranas de los eritrocitos, en concordancia con resultados publicados por otros autores ([8725], [8726], [8727]).

Por último, el resto de correlaciones halladas que aparentemente no presentarían una relación conocida, y de las que no existen datos en la literatura, podrían ser debidas tanto al efecto del metabolismo de los ácidos grasos como a la covarianza de los parámetros implicados, sin existir aparentemente una relación causa-efecto.

En definitiva, los resultados de este estudio mostraron variaciones en los niveles de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos entre la población de mujeres sanas y de pacientes de cáncer de mama, pudiendo ser debidas, al menos en parte, tanto a la influencia nutricional como a las alteraciones en el metabolismo lipídico como consecuencia del proceso carcinogénico mamario ([6575], [7321], [7463]). Por otro lado, el estudio de asociaciones entre la ingesta dietética estimada y el perfil de ácidos grasos de las membranas de los eritrocitos mostró que el ácido margárico (C17:0) sería el que más específicamente reflejaría el consumo de ácidos grasos saturados, tal y como han descrito otros autores ([6698]). En el caso de los ácidos grasos monoinsaturados, los resultados obtenidos indicarían que su contenido en las membranas eritrocitarias no reflejaría la ingesta de estos lípidos evaluada mediante los cuestionarios de frecuencia de consumo. Por último, los niveles de ácido docosadienoico (C22:2) y eicosapentanoico (EPA-C20:5) en tales membranas podrían reflejar la ingesta estimada de poliinsaturados omega 6 y omega 3 (de origen marino), respectivamente. A partir de todos estos resultados, y teniendo en cuenta las limitaciones de ambas metodologías, se emplearon los datos obtenidos en estos dos tipos de evaluaciones nutricionales para realizar el estudio de correlaciones entre los hábitos dietéticos y los patrones de metilación del ADN.

3. ESTUDIO EPIGENÉTICO EN HUMANOS: METILACIÓN DEL ADN

En cáncer han sido descritas una serie de alteraciones a nivel epigenético que favorecerían tanto la iniciación como la progresión neoplásica. Dichas aberraciones se caracterizan a nivel de metilación del ADN por la disminución de la metilación global del genoma y por el incremento de la metilación de regiones promotoras de genes supresores tumorales ([8531]).

Actualmente son muchos los trabajos centrados en la búsqueda de biomarcadores epigenéticos capaces de reflejar los patrones de metilación de la masa tumoral y cuya obtención de muestra requiera de procedimientos menos invasivos que las biopsias mamarias, como sería el caso de la utilización de sangre periférica. En este sentido, existen trabajos basados en hallar patrones de metilación en ADN leucocitario asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar determinados tipos de neoplasias, evaluando por tanto su aplicabilidad como biomarcador de riesgo en cáncer ([7555], [8730]). Por otro lado, dado el carácter reversible de las modificaciones epigenéticas, el empleo de ADN leucocitario permitiría también estudiar la influencia de determinados factores ambientales, entre ellos la dieta, sobre el epigenoma del individuo ([7555], [8730])

En el presente trabajo se realizó una caracterización del estado de metilación del ADN a nivel global y gen-específico en muestras de elementos formes (leucocitos) de voluntarias sanas y de pacientes de cáncer de mama, así como de glándula mamaria y de tejido tumoral de pacientes. En última instancia, se estudio la asociación entre los datos moleculares obtenidos en los diferentes tejidos y los parámetros clínicos y de estilo de vida, con la finalidad de definir cambios epigenéticos implicados en el desarrollo del cáncer de mama y evaluar su posible modulación por factores dietéticos.

3.1. Metilación global del genoma

La metilación del ADN a nivel genómico es un mecanismo epigenético de gran relevancia biológica implicado en la regulación de diversos procesos. Así, se ha descrito que la metilación en regiones no codificantes del ADN garantizaría la conformación e integridad de los cromosomas ([8492]), mientras que la metilación de secuencias repetitivas del genoma de tipo retrotransposones, tales como secuencias LINE-1 (“Long interspersed nuclear element-1”), evitaría fenómenos de inestabilidad cromosómica al impedir la movilización de dichas secuencias ([8493]). Dado que en el genoma existen aproximadamente 500.000 copias de

secuencias LINE-1 (17% del genoma) ricas en dinucleótidos CpG normalmente en estado metilado, y que se estima que 1/3 de la metilación del ADN tiene lugar en secuencias de elementos repetitivos, el grado de metilación de secuencias LINE-1 se ha considerado un buen estimador de la metilación global del genoma ([7813]).

Por lo que respecta a la **sangre periférica**, se ha descrito un descenso en el grado de metilación de secuencias LINE-1 en ADN de células sanguíneas periféricas de pacientes con diversos tipos de neoplasias, tales como cáncer de cabeza y cuello ([8746]), gástrico ([8744]) y de vejiga ([8745]). Sin embargo, otros autores han hallado un incremento en los niveles de metilación de retrotransposones LINE-1 en sangre periférica de pacientes con cáncer renal ([8748]) y pancreático ([8749]). En relación al cáncer de mama, los resultados no son del todo concluyentes, hallándose algunos autores que describen un descenso en los niveles de metilación de tales secuencias en sangre periférica de pacientes ([8738]), mientras que otros no encuentran asociaciones significativas ([8684], [8739]). En cuanto al presente trabajo, los resultados obtenidos mostraron un incremento, aunque de forma cercana a la significación, en el grado de metilación de secuencias LINE-1 en sangre periférica de las pacientes de cáncer de mama en relación a las sanas. Esto sugiere que la estimación de la metilación global del genoma mediante el análisis de secuencias LINE-1 en ADN leucocitario no sería un buen reflejo de la hipometilación genómica que acontece en tejido tumoral ya que ambos parámetros podrían no covariar en el mismo sentido, a pesar de que en las pacientes el grado tumoral correlacionó negativamente con la metilación genómica en sangre periférica. Aunque se ha descrito la presencia en el torrente sanguíneo de ADN tumoral libre y de células tumorales circulantes ([8797]), su caracterización requiere de métodos analíticos extremadamente sensibles, empleados en combinación con procedimientos de detección y purificación ([8798]). Por este motivo, es poco probable que los resultados obtenidos en sangre periférica de las pacientes se deban a la detección de ADN tumoral libre ó de células tumorales circulantes. Por otro lado, las diferencias halladas entre ambas poblaciones podrían ser debidas, al menos en parte, al efecto del proceso carcinogénico sobre la alteración de las subpoblaciones de leucocitos circulantes ([8733]). A pesar de la diferencia de edad hallada entre poblaciones, el aumento de metilación global en enfermas no sería atribuible a este parámetro dado que se ha descrito un descenso de la metilación genómica asociado al envejecimiento ([8754]). En relación a la posible alteración de las subpoblaciones de leucocitos, en diversos tipos de neoplasias se ha descrito un incremento de células mieloides y un descenso de células linfoides circulantes en sangre periférica ([8733], [8799]). Además, existen estudios que ponen de manifiesto que el grado de metilación del ADN en sangre

periférica varía en función de las proporciones de células sanguíneas circulantes ([8734], [8736], [8737]), de tal forma que el grado de metilación de LINE-1 se asociaría positivamente con el porcentaje de neutrófilos y de manera negativa con el de linfocitos ([8616]). Por tanto, una disminución en la población de linfocitos, respecto a las células mieloides, sería compatible con un incremento de la metilación de LINE-1 en ADN leucocitario. Además, estos datos serían concordantes con otros estudios que muestran que los patrones de metilación del ADN son tejido-específicos ([8732]), hecho también reflejado en el presente trabajo dado el mayor grado de metilación de secuencias LINE-1 hallado en sangre periférica de las pacientes en comparación con el tejido mamario ([8684]). En cuanto a la influencia por factores ambientales, en elementos formes no se hallaron asociaciones claras entre el grado de metilación global del ADN y las variables nutricionales analizadas. Esta falta de correlaciones podría estar relacionada, por un lado, con el reducido tamaño muestral de la población de sanas, y por otro lado, con la influencia sobre la metilación genómica de la variabilidad poblacional de leucocitos en enfermas.

En cuanto a los **tejidos mamarios**, en cáncer se ha descrito un descenso en la metilación de secuencias tipo LINE-1, y por tanto de los niveles de metilación global del ADN, durante el transcurso del proceso canceroso, hallándose una menor metilación en tejido tumoral en relación al tejido sano adyacente ([8527], [8747]). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo serían compatibles con dichas evidencias dada la disminución en el grado de metilación de secuencias LINE-1 hallada en tejido tumoral en comparación con la glándula mamaria de las pacientes. Por otro lado, la hipometilación genómica en tumor se ha asociado a peor pronóstico clínico en diversos tipos de neoplasias, incluyendo el cáncer de mama ([8740], [8741], [8742], [8743]). Contrariamente a lo esperado, el estadio tumoral se asoció negativamente, en términos generales, con el grado de metilación global del ADN en tumor, probablemente debido al reducido tamaño muestral de algunos subtipos de estadios tumorales, hecho que implicaría que los valores de metilación genómica de tales grupos no fueran representativos. Esto también podría explicar las diferencias halladas en las asociaciones entre metilación genómica en glándula mamaria y expresión tumoral de los receptores de estrógenos y progesterona. Además, la metilación global del ADN en glándula mamaria podría no ser un buen reflejo del grado de malignidad tumoral dado que ambos parámetros podrían no covariar en el mismo sentido. Por otra parte, no se hallaron asociaciones claras entre el grado de metilación global del tejido mamario y los factores clínicos y/o de estilo de vida analizados, a excepción de las correlaciones positivas halladas, en general, con la ingesta de vitaminas B₂, B₆ y B₁₂. Esto podría estar relacionado con que dichas vitaminas son

consideradas donadores de grupos metilo y, por tanto, podrían estar incrementando la formación de SAM (S-adenosil-L-metionina) que actúa como sustrato de las enzimas ADN metiltransferasas, favoreciendo consecuentemente la metilación del ADN ([8558]). Por todo ello, y en términos generales, los resultados obtenidos en este estudio hasta el momento sugerirían que los factores nutricionales y de estilo de vida evaluados ejercerían una débil influencia sobre el grado de metilación global de la glándula mamaria y del tejido tumoral. A pesar de ello, no se puede descartar que la influencia del estilo de vida sea significativa, dado que el efecto que podría estar ejerciendo la propia enfermedad sobre la metilación genómica podría enmascarar la sutil influencia ambiental, sobretodo en estadios avanzados de la carcinogénesis.

En definitiva, los resultados obtenidos en el estudio de la metilación global del ADN mediante el análisis de secuencias repetitivas LINE-1 pusieron de manifiesto la hipometilación global del genoma que tiene lugar en tejido tumoral durante el proceso carcinogénico ([8527], [8747]). Sin embargo, el grado de metilación de dichas secuencias en sangre periférica de pacientes no reflejó la hipometilación hallada en tumor, limitando de este modo el uso del grado de metilación de secuencias LINE-1 como biomarcador en sangre periférica de la hipometilación genómica asociada al proceso carcinogénico mamario. Por todo ello, se podría plantear la determinación de la metilación global del ADN mediante otras técnicas cuantitativas ([8735]), tales como el ensayo LUMA empleado en el estudio en el modelo experimental, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o bien mediante el análisis de otros tipos de secuencias repetitivas del ADN ricas en dinucleótidos CpG, como secuencias Alu y satélite 2 (Sat2). Otras posibilidades incluirían el aislamiento de células tumorales circulantes en sangre periférica o la purificación de ADN tumoral libre en plasma, hecho que permitiría evaluar en sangre periférica el perfil de metilación de la masa tumoral ([8797]). Por otro lado, el grado de metilación global del ADN en glándula mamaria y tumor no parece estar claramente influido por factores dietéticos y/o de estilo de vida, sugiriendo que en estadios localmente avanzados de la carcinogénesis mamaria la influencia de la propia enfermedad sobre dicho parámetro podría sobrepasar una débil influencia ambiental. En este sentido, la ampliación del estudio en muestras de tumores de estadios iniciales permitiría evaluar mejor la influencia de factores ambientales sobre el epigenoma del tejido mamario.

3.2. Metilación gen-específica

La metilación del ADN es un proceso epigenético de gran trascendencia también a nivel gen-específico debido a su implicación en la regulación fisiológica de la expresión génica, asociándose la metilación de dinucleótidos CpG presentes en regiones promotoras con silenciamiento génico. En cáncer este mecanismo epigenético presentaría aberraciones caracterizadas por la hipometilación de promotores de proto-oncogenes resultando en la activación de su expresión, y por la hipermetilación de genes supresores tumorales con su consecuente silenciamiento. Ha sido ampliamente descrito que el perfil de metilación del ADN depende tanto del tipo de neoplasia como del gen y tejido en estudio ([8776]). Así, dado que no existe un único gen hipermetilado en todos los tipos de cáncer sino que, en este sentido, existe una elevada heterogeneidad, se hace evidente la necesidad de emplear paneles de genes que permitan lograr una alta sensibilidad y especificidad en la caracterización del tipo de neoplasia en estudio ([6214], [7555], [8764], [8765]). En cáncer de mama, en concreto, numerosos genes han sido descritos como frecuentemente hipermetilados ([6609]), afectando las características adquiridas por las células neoplásicas, comúnmente llamadas “hallmarks” del cáncer ([3973], [7349]). De todos ellos se seleccionó un panel formado por los siguientes 12 genes: BRCA1, p16, RAR β 2, ESR1 -RE α -, PGR -PRB-, RASSF1A, NES1, TWIST1, MASPINA, CDH1 -E-cadherina-, CXCL12 y HLA-A ([6609]). Todos estos genes se han encuadrado en los diferentes “hallmarks” del cáncer (véase la Figura 17 del apartado B1.3.1 de Material y Métodos) participando, por tanto, en la adquisición de dichas características. Sin embargo, dado que cada vez hay más evidencias de que ejercen diversas funciones biológicas, se discutirán de forma integrada. Así, la proteína BRCA1 (“Breast Cancer 1”) está implicada en la regulación de la reparación de daño en el ADN por recombinación homóloga de roturas de la doble cadena, en la regulación transcripcional, la remodelación de la cromatina, la progresión del ciclo celular y la apoptosis ([8785]). En referencia al gen p16 ó CDKN2A, éste codifica para la proteína p16^{INK4A} reguladora del ciclo celular mediante su acción como inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina CDK4 y CDK6 ([8783]). Por otro lado, el gen RAR β 2 codifica para el receptor del ácido retinoico β 2 que ejerce acciones antiproliferativas, así como de inducción de la diferenciación y de la apoptosis ([8784]). En relación a los genes ESR1 (“Estrogen Receptor 1”) y PGR (“Progesterone Receptor”), éstos codifican para el receptor de estrógenos α (RE α) y el de progesterona, respectivamente. En el presente trabajo se estudió la isoforma B del receptor de progesterona (PRB). Ambos receptores hormonales actúan como factores de transcripción y ejercen funciones relevantes

en el desarrollo fisiológico y patológico de la glándula mamaria ([2631], [4577], [5685], [8786]). Por lo que respecta a la proteína RASSF1A (“Ras association domain family 1 isoform A”), ésta estaría implicada en la regulación de diversos procesos biológicos, tales como la dinámica de los microtúbulos, el mantenimiento de la estabilidad genómica, la progresión del ciclo celular y la modulación de la apoptosis ([6237]). Por su parte, el gen NES1 (“normal epithelial cell-specific 1”-KLK10) codifica para la serina proteasa hK10 (“human Kallikrein 10”) que ejerce acciones inhibitoras de la proliferación celular ([8787]). Por otro lado, el gen TWIST1 codifica para un factor de transcripción, sobreexpresado en varios tipos de cánceres, que presenta funciones antiapoptóticas y prometastásicas debido a que favorece la transición epitelio-mesénquima. A pesar de ello, en cáncer también se ha descrito hipermetilación de su región promotora ([8780]), asociándose a peor pronóstico clínico ([7457]). En cuanto al gen MASPINA, éste codifica para una proteína de la familia de inhibidores de serina proteasas (serpinas) que ejerce acciones antiangiogénicas así como de inhibición de la invasión celular y metástasis ([8779]). Por su parte, el gen CDH1 (“Cadherin 1”) codifica para la glicoproteína E-cadherina implicada en la formación, mantenimiento y homeostasis del epitelio mediante la regulación de la adhesión célula-célula dependiente de calcio. Otro gen implicado en invasión y metástasis es CXCL12, que codifica para la quimiocina CXCL12, también llamada SDF-1 (“Stromal cell-derived factor 1”), que actúa como ligando del receptor CXCR4 ([8781]). Por último, el gen HLA-A (“antígeno leucocitario humano A”) codifica para la glicoproteína HLA-A, subtipo del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), encargada de la presentación de péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (T^{CD8^+}) ([7452]).

Estudio cualitativo de la metilación gen-específica

En primer lugar, se determinó de forma cualitativa el estado de metilación gen-específica por “MSP” del panel de los 12 genes en muestras de elementos formes de sangre periférica de voluntarias sanas y de pacientes de cáncer de mama, así como de glándula mamaria y de tejido tumoral de pacientes. En el caso de los genes BRCA1, ESR1 y p16 no se analizaron todas las muestras disponibles de los distintos tejidos por motivos metodológicos. Por esta razón, y en base a la relevancia de los genes BRCA1 y ESR1 en cáncer de mama ([6609]), se consideró de interés ampliar el estudio cualitativo de dichos genes mediante pirosecuenciación, tal y como se comentará posteriormente.

Los resultados obtenidos por “MSP” en **sangre periférica** de sanas y enfermas de cáncer de mama mostraron perfiles de metilación similares en ambas poblaciones, observándose una gran variabilidad en las frecuencias de metilación entre los diferentes genes. Así, la alta frecuencia de metilación hallada en elementos formes en las dos poblaciones para los genes ESR1, PRB, NES1, MASPINA y CDH1, sugeriría que la expresión génica en leucocitos de dichos genes podría no tener tanta relevancia biológica como en otros tejidos, dado que la metilación del ADN se ha considerado uno de los mecanismos principales de regulación de la expresión tejido-específica ([8776]). En este sentido, estudios publicados en la literatura también muestran altas frecuencias de metilación en leucocitos para los genes ESR1, PRB, MASPINA y CDH1 ([6202], [8711], [8761], [8763]), en concordancia con los resultados de este trabajo. Sin embargo, en el caso del gen NES1 no se han encontrado datos sobre su frecuencia de metilación en sangre periférica. Pese a ello, diversos estudios a nivel de proteína han puesto de manifiesto que la serina proteasa codificada por dicho gen se encuentra altamente expresada en ovario, próstata, testículos y tejido mamario, siendo posteriormente secretada a diferentes fluidos biológicos incluyendo el suero ([8762]). Así, se podría postular que, debido a que es una proteína presente en suero, en leucocitos no se requiriesen altos niveles de expresión del gen NES1, hallándose por tanto, su región promotora en estado metilado. Por otro lado, la comparación entre poblaciones del estado de metilación de estos 12 genes en sangre periférica puso de manifiesto mayor frecuencia de metilación en los genes BRCA1 y RASSF1A en elementos formes de enfermas de cáncer de mama. Estos resultados sugieren un potencial papel como marcador de riesgo de dichos genes, tal y como se discutirá posteriormente junto con los resultados del análisis cuantitativo. Contrariamente a lo esperado, la frecuencia de metilación del gen ESR1 fue superior en elementos formes de voluntarias sanas. Este hecho podría estar relacionado, tal y como se ha comentado anteriormente, con la alteración de las subpoblaciones de leucocitos por efecto del proceso carcinogénico ([8733], [8788]), pudiendo estar a su vez asociado al papel de los estrógenos sobre la regulación del sistema inmune ([8753]). Además, la comparación en enfermas del estado de metilación de los 12 genes en sangre periférica y tejido mamario evidenció la especificidad de la metilación del ADN, siendo ésta dependiente del gen y del tejido en estudio ([8776]).

En cuanto al estudio en los **tejidos mamaros**, los resultados obtenidos mostraron perfiles de metilación similares entre glándula mamaria y tumor, con frecuencias de metilación siempre superiores en tejido tumoral, siendo dicho incremento estadísticamente significativo para los genes RAR β 2, RASSF1A, TWIST1, PRB, NES1, CDH1 y HLA-A, y cercano a la significación para ESR1. Para estos genes, las frecuencias de metilación obtenidas en

glándula mamaria y tumor estarían en concordancia con datos publicados por otros autores en cáncer de mama ([6218], [8684], [8777], [8778]). Así, el incremento en la frecuencia de metilación de dichos genes en tejido tumoral podría estar indicando su relevancia en el proceso carcinogénico mamario, pudiendo ser considerada la metilación de sus regiones promotoras como uno de los mecanismos moleculares a nivel epigenético del cáncer de mama humano. En este sentido, la hipermetilación de los genes RAR β 2 ([7563], [8752]), RASSF1A ([7457], [8755]) y TWIST1 ([7457]) se ha asociado con peor pronóstico clínico en cáncer de mama. En cuanto a los genes ESR1 y PRB, su silenciamiento génico por hipermetilación se ha relacionado con crecimiento hormono-independiente y, también, con mal pronóstico en este tipo de neoplasia ([8751]). Por su parte, en cáncer de mama la hipermetilación del gen NES1 ha sido asociada con un incremento de la capacidad tumorigénica ([8757]), la del gen CDH1 (E-cadherina) con el aumento de la capacidad celular invasiva y metastásica ([8782]), y, por último, la del gen HLA-A con una mayor capacidad de evasión del sistema inmune ([8756]).

Por otro lado, los genes BRCA1, p16, MASPINA y CXCL12 no mostraron un incremento significativo en la frecuencia de metilación en tejido tumoral en relación a la glándula mamaria. En el caso del gen BRCA1, diversos trabajos han descrito frecuencias de metilación en tumor del 13-41%, parecidas a las halladas en el presente estudio ([6218], [8684], [8774], [8778]). Se ha postulado que la hipermetilación gen-específica en tejido glandular adyacente al tumor podría ser debida a la presencia de células tumorales diseminadas ([8775]), lo que explicaría que la frecuencia de detección de metilación de BRCA1 en glándula mamaria fuese similar a la obtenida en tumor. Sin embargo, los trabajos publicados en relación a la detección por “MSP” de ADN proveniente de células tumorales diseminadas se basan en una previa purificación de dicho ADN ([8772], [8773]), por lo que parece poco probable que los resultados obtenidos en este trabajo sean debidos a la detección de ADN tumoral en glándula mamaria. En cualquier caso, para comprobar esta hipótesis sería necesario incluir en el presente estudio tejido glandular mamario de voluntarias sanas. En cuanto al gen p16, los resultados mostraron bajas frecuencias de metilación en ambos tejidos mamaros, en concordancia con trabajos publicados por otros autores ([6257], [8771]). Sin embargo, la mayoría de los datos hallados en la literatura describen una frecuencia de metilación del gen p16 del 17-48% ([8768], [8769], [8770], [8778]). Esta discordancia podría estar relacionada con las diferentes regiones del promotor del gen p16 analizadas, de tal forma que las posiciones CpG evaluadas por “MSP” en este trabajo podrían no ser representativas de la frecuencia de metilación global del promotor del gen p16 en cáncer de mama. En relación al

gen MASPINA, se hallaron altas frecuencias de metilación tanto en glándula mamaria como en tumor. Dado que la proteína MASPINA es una serpina específica mamaria y, por tanto, su expresión en este tejido contribuiría a la fisiología de la glándula mamaria, las altas frecuencias de metilación halladas en ambos tejidos mamarios podrían ser debidas, tal y como han sugerido otros autores, a que la hipermetilación de la región promotora de este gen podría ser un evento temprano en la carcinogénesis mamaria ([6949]). Por último, la hipermetilación del gen CXCL12 en tejido tumoral se ha asociado con cáncer de mama metastásico ([8766], [8767], [8781]). Así, el silenciamiento epigenético de dicho gen y la sobreexpresión del receptor CXCR4 en tejido tumoral favorecería la diseminación de células metastásicas a órganos diana con alta expresión de CXCL12, correspondiendo éstos al tejido óseo, hígado y pulmón en el caso del cáncer de mama ([8781]). Por tanto, en el presente trabajo, y teniendo en cuenta que la mayoría de tumores analizados corresponden a estadios localmente avanzados, se obtuvieron frecuencias de metilación del gen CXCL12 relativamente bajas, desconociéndose su significado biológico.

En definitiva, en las células tumorales la hipermetilación de los genes RAR β 2, RASSF1A, TWIST1, PRB, ESR1, NES1, CDH1 y HLA-A conllevaría la desregulación del ciclo celular (mediante el incremento de la capacidad proliferativa, la autosuficiencia en señales de proliferación y la insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento), así como la adquisición de una mayor capacidad de evasión del sistema inmune y capacidad invasiva y metastásica. Todo ello estaría favoreciendo la adquisición de un fenotipo celular más maligno, derivando, en última instancia, en la estimulación de la progresión neoplásica. Por otro lado, del panel de los 12 genes analizados por “MSP”, el gen RASSF1A sería el que mejor se ajustaría al perfil de biomarcador epigenético de riesgo, dado el incremento en la frecuencia de metilación hallado en los distintos tejidos (sangre periférica de sanas, sangre periférica de pacientes, glándula mamaria y tejido tumoral).

Estudio cuantitativo de la metilación gen-específica

A partir de los resultados obtenidos por “MSP”, se seleccionó nuevamente un panel de 3 genes para ampliar el estudio del estado de metilación gen-específica mediante técnicas cuantitativas. Con la finalidad de aumentar la especificidad de dicho panel en relación a la carcinogénesis mamaria, se consideró de interés la inclusión en este estudio de 2 genes relevantes en la etiología del cáncer de mama (BRCA1 y ESR1) ([6609]), así como del gen

RASSF1A, descrito como frecuentemente alterado en numerosas neoplasias incluida la de mama ([8759]).

Por lo que respecta al **gen BRCA1**, la determinación cuantitativa del estado de metilación se realizó mediante pirosecuenciación. Los resultados obtenidos mostraron un mayor grado de metilación de este gen supresor tumoral en sangre periférica de pacientes de cáncer de mama en comparación con las sanas, así como niveles similares de metilación entre glándula mamaria y tejido tumoral. Estos resultados irían en el mismo sentido que los obtenidos en el estudio cualitativo, sugiriendo que la hipermetilación del gen BRCA1 podría ser un evento temprano en la carcinogénesis mamaria, tal y como ha sido propuesto por otros autores ([8774]). El hecho de ser un evento temprano podría resultar en que dicha metilación no refleje el grado de malignidad tumoral en fases muy posteriores, debido a la acumulación de múltiples alteraciones y diferentes mecanismos de silenciamiento de genes supresores tumorales. De hecho, en este trabajo, no se han hallado asociaciones claras entre la metilación del gen BRCA1 en tumor y los parámetros histopatológicos tumorales evaluados. Por otro lado, no se puede descartar que los resultados obtenidos en sangre periférica estén influidos por la diferencia de edad hallada entre las dos poblaciones, dado que ha sido descrito un incremento de la metilación gen-específica asociada al envejecimiento ([8754]). Sin embargo, la falta de correlaciones entre el grado de metilación de BRCA1 en los distintos tejidos y la variable edad, sugerirían que la influencia que ejercería la edad sobre la metilación de BRCA1 podría no ser tan relevante como en otros genes. En cualquier caso, teniendo en cuenta la necesidad de ampliar el estudio para homogeneizar las poblaciones y considerando por tanto las limitaciones de los resultados, el incremento hallado hasta el momento en el grado de metilación en sangre periférica de enfermas, respecto al de las sanas, sugiere que el gen BRCA1 sería un candidato a biomarcador epigenético de riesgo de cáncer de mama humano. Además, las correlaciones positivas halladas en todos los tejidos, en general, entre la metilación del gen BRCA1 y algunos parámetros de historia reproductiva (edad en la primera gestación y edad de aparición de la menopausia) y a su vez relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama ([3950], [3966], [5975]), reforzarían al gen BRCA1 como candidato a biomarcador de riesgo.

En cuanto al **gen ESR1**, el análisis cuantitativo de la metilación gen-específica se realizó tanto mediante el ensayo “COBRA” como por pirosecuenciación. Por lo que respecta al ensayo “COBRA”, la falta de diferencias significativas en el grado de metilación de ESR1 entre elementos formes de sanas y enfermas, así como entre tejidos mamarios (sano y tumoral), sugiere que la posición CpG analizada (presente en la diana de restricción de *BstUI*)

podría no ser un buen reflejo del grado de metilación global del gen ESR1 en cáncer de mama humano. Por su parte, el análisis por pirosecuenciación mostró, tal y como se esperaba, mayor sensibilidad de detección de metilación que el ensayo “COBRA”, observándose niveles de metilación del gen ESR1 superiores en sangre periférica de enfermas que en sanas. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en el grado de metilación de dicho gen entre glándula mamaria y tumor. Estos resultados sugerirían que la hipermetilación del gen ESR1 podría tener lugar también de forma temprana en el proceso carcinogénico mamario, tal y como han sugerido otros autores ([8760]), y en concordancia con la falta de asociaciones claras entre la metilación del gen ESR1 en tumor y los parámetros histopatológicos tumorales. En cuanto a las diferencias halladas en sangre periférica, no se puede descartar que el incremento en el grado de metilación de ESR1 en elementos formes de enfermas pueda ser debido, al menos en parte, a la diferencia de edad existente entre las dos poblaciones, dadas las correlaciones positivas halladas entre ambos parámetros. La ampliación del estudio con un mayor número de voluntarias que homogenice la edad de ambas poblaciones permitirá consolidar o descartar al gen ESR1 como biomarcador epigenético de riesgo de cáncer de mama humano. En cualquier caso, el grado de metilación de ESR1 mostró también correlaciones positivas, en todos los tejidos en general, con algunos parámetros reproductivos, tal y como sucedía con el gen BRCA1, estando éstos asociados a su vez a un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama ([3950], [3966], [5975]). Por una parte, estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de los genes BRCA1 y ESR1 en tejidos relacionados con la reproducción incluyendo la glándula mamaria y sugieren que dichos factores podrían aumentar el riesgo de cáncer de mama alterando patrones epigenéticos en el tejido mamario. Por otra parte, estos genes serían candidatos a marcador de riesgo, bien porque su grado de metilación en ADN leucocitario podría covariar con la enfermedad, bien porque refleje una variabilidad epigenética individual de riesgo.

En referencia al **gen RASSF1A**, los resultados obtenidos, tanto por “COBRA” como por pirosecuenciación, pusieron de manifiesto el mayor grado de metilación de dicho gen en tejido tumoral respecto a glándula mamaria, tal y como está descrito ([8758]). Así, la metilación del gen RASSF1A podría jugar un papel relevante en el proceso carcinogénico mamario, estando asociado su silenciamiento génico a peor pronóstico clínico en este tipo de neoplasia ([7457], [8755]). Por otro lado, la hipermetilación del gen RASSF1A se considera un evento temprano en la carcinogénesis mamaria ([8696], [8697]), de forma que, nuevamente, el grado de metilación de RASSF1A podría no reflejar la malignidad tumoral, en concordancia con la falta de asociaciones claras obtenidas en este estudio entre los niveles de

metilación de dicho gen en tumor y los parámetros histopatológicos tumorales evaluados. A diferencia de los genes BRCA1 y ESR1, el grado de metilación de RASSF1A no se asoció con parámetros relacionados con la reproducción. Por otra parte, en enfermas se hallaron asociaciones positivas entre la edad y el estado ovárico (variable dependiente de la edad) y la metilación del gen RASSF1A en tejidos mamarios. En este sentido, las enfermas premenopáusicas mostraron un menor grado de metilación de RASSF1A en glándula mamaria en relación a las perimenopáusicas y postmenopáusicas. Estos resultados serían compatibles con el incremento de la metilación gen-específica en glándula mamaria asociado a la edad ([8754]). En cuanto a los resultados en sangre periférica, la hipermetilación de RASSF1A en tejido tumoral no se reflejó en el perfil de metilación leucocitario, dada la falta de diferencias significativas en elementos formes entre sanas y enfermas.

En definitiva, los resultados del estudio del estado de metilación gen-específica sugieren que, del total de los 12 genes analizados, los genes RAR β 2, PRB, RASSF1A, NES1, TWIST1, CDH1, HLA-A y ESR1 podrían ejercer funciones relevantes en la carcinogénesis mamaria humana dado el incremento de la frecuencia de metilación hallado en tejido tumoral. Así, la hipermetilación de sus regiones promotoras podría ser, entre otros, uno de los mecanismos moleculares a nivel epigenético responsables de su silenciamiento génico, hecho que facilitaría tanto la transformación neoplásica como el transcurso del propio proceso carcinogénico mamario. Por otro lado, los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A podrían ser candidatos a biomarcadores de riesgo de cáncer de mama humano, basándose en la frecuencia (BRCA1 y RASSF1A) y en el grado de metilación (BRCA1 y ESR1) de sus regiones promotoras en sangre periférica. Sin embargo, sería necesaria la ampliación del tamaño muestral así como homogeneizar la edad entre ambas poblaciones para consolidar dichos resultados. Además, sería de utilidad la inclusión en el estudio cuantitativo de nuevos genes relevantes en la carcinogénesis mamaria con la finalidad de incrementar la sensibilidad y especificidad del panel de genes.

Influencia del estilo de vida sobre la metilación gen-específica

Los análisis de correlaciones entre los datos clínicos y de estilo de vida y los obtenidos a nivel molecular mostraron un mayor número de correlaciones significativas en elementos formes que en tejido mamario, sugiriendo que dichos factores ejercerían una mayor influencia sobre el estado de metilación en sangre periférica (ADN leucocitario) y/o en el epigenoma del

individuo en general, que en glándula mamaria y tumor. También cabe la posibilidad de que fuera más fácil detectar la influencia de tales factores ambientales sobre el epigenoma en leucocitos que en tejido mamario, sobretodo en tumor, donde el efecto del cáncer podría sobrepasar al de los factores dietéticos y/o de estilo de vida.

Por lo que respecta a los **factores dietéticos**, los resultados obtenidos en sangre periférica mostraron que el grado de metilación de los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A en elementos formes de enfermas correlacionó positivamente con el consumo de lípidos totales y de saturados y, en el caso de los genes BRCA1 y ESR1, también con la ingesta de energía total y de vitamina B₂. En cuanto al consumo de monoinsaturados, se hallaron resultados contradictorios en función del método de estimación de la ingesta empleado. Así, la metilación de los 3 genes en sangre periférica de enfermas correlacionó positivamente con la ingesta de monoinsaturados estimada a través de los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos, y negativamente con la presencia de ácidos grasos monoinsaturados en las membranas eritrocitarias. En relación a los tejidos mamaros, los resultados obtenidos mostraron que el grado de metilación de los genes BRCA1 y ESR1 en glándula mamaria y tumor estaría más influido por los factores dietéticos evaluados que en el caso del gen RASSF1A. Así, en enfermas los niveles de metilación de BRCA1 y ESR1 correlacionaron positivamente con una mayor ingesta de proteínas, ácidos grasos saturados y donadores de grupos metilo (vitaminas B₂, B₆ y B₁₂), y en el caso del gen BRCA1 además con el consumo de lípidos totales. Por su parte, la ingesta de monoinsaturados y poliinsaturados, evaluada mediante cuestionarios o a través de las membranas eritrocitarias, no mostró resultados consistentes, asociándose, en cualquier caso, el consumo de monoinsaturados y poliinsaturados omega 6 con un incremento de la metilación gen-específica en tejido mamario, a excepción del gen RASSF1A cuya metilación correlacionó inversamente con la ingesta de poliinsaturados omega 6.

Por todo ello, y teniendo en cuenta la necesidad de ampliar el tamaño muestral, los resultados obtenidos hasta el momento sugerirían que la ingesta calórica, el consumo de proteínas, lípidos totales, ácidos grasos saturados y vitaminas B₂, B₆ y B₁₂, se asociarían con un mayor grado de metilación gen-específica, sobretodo de los genes BRCA1 y ESR1 en los diferentes tejidos. Estos resultados sugieren que dichos factores nutricionales podrían estar influyendo sobre el riesgo de cáncer de mama, en parte, mediante la alteración de los patrones epigenéticos. En este sentido, los estudios epidemiológicos han demostrado una asociación positiva entre el aporte calórico de las dietas y las tasas de mortalidad por cáncer de mama, coincidiendo con resultados experimentales que describen una estimulación del desarrollo

tumoral por parte de las dietas hipercalóricas ([868], [920]). En cuanto a la ingesta de proteínas, estudios epidemiológicos y experimentales también han descrito que un elevado consumo de proteínas podría incrementar el riesgo de cáncer de mama, probablemente mediante el aumento de los niveles de IGF-1 ([8645], [8646]), ([8647]). En relación a los lípidos, los trabajos epidemiológicos no han mostrado siempre datos concluyentes ([6093]), aunque estudios prospectivos han determinado que un consumo elevado de grasas, independientemente del tipo, estaría asociado a un elevado riesgo de cáncer de mama ([6321]). Por su parte, los estudios experimentales han mostrado que dicho efecto depende del tipo y de la cantidad de grasa ingerida, así como del hecho de su presencia en ciertas fases críticas de la carcinogénesis y del estado de diferenciación de la glándula mamaria ([3338], [5816], [7145]). De tal forma que, en general, los PUFA n-6, fundamentalmente el ácido linoleico, serían los principales estimuladores de la carcinogénesis experimental ([1358], [3568], [3672], [4324]), mientras que los PUFA n-3, principalmente el ácido α -linolénico y los de cadena larga de origen marino, serían inhibidores del crecimiento tumoral mamario y la metástasis ([1486], [3568], [3615], [4324], [4353]). En cuanto a las grasas saturadas, éstas también serían promotoras de la carcinogénesis, pudiendo actuar, además, como co-carcinógenos durante la iniciación ([920], [1486], [3205]). Por lo que respecta a los ácidos grasos monoinsaturados, fundamentalmente el ácido oleico, se ha observado desde un efecto no promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama ([3568], [5321], [7144]). Por otro lado, en la literatura existen pocos datos de la influencia de factores nutricionales sobre la metilación de genes relevantes en cáncer. Pese a ello, ha sido descrito que dietas bajas en proteínas pueden reducir la disponibilidad de homocisteína (precursor de metionina) derivando en hipometilación del ADN ([8563]). En relación a la ingesta de lípidos, también son escasos los datos existentes hasta el momento, hallándose un estudio epidemiológico que ha descrito un incremento en el grado de metilación del gen supresor tumoral RAR β 2 en ADN leucocitario tras el consumo de dietas altas en grasas ([7003]). Además, en un modelo murino de cáncer de mama metastásico ha sido descrito el incremento en el grado de metilación del gen CDH1 en tejido tumoral tras alimentar a dichos animales con dietas hiperlipídicas ([8594]). En el caso de las vitaminas B2, B6 y B12, tal y como se ha comentado previamente, éstas son donadores de grupos metilo, sugiriendo que una elevada ingesta de tales vitaminas podría incrementar la formación de SAM, sustrato de las enzimas ADN metiltransferasas, favoreciendo consecuentemente la metilación del ADN ([8558]).

En cuanto a **otros factores relacionados con el estilo de vida**, en enfermas la realización de actividad física correlacionó negativamente con el grado de metilación del gen ESR1 en

glándula mamaria. En este sentido, el ejercicio físico moderado ha mostrado una asociación inversa con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, sobretodo en mujeres postmenopáusicas ([6093]). A su vez, diversos estudios han asociado la realización de actividad física con alteraciones a nivel epigenético, incluyendo la disminución del grado de metilación gen-específica ([8595], [8596], [8597]). Así, la realización de ejercicio físico durante al menos un año ha sido inversamente relacionado con la hipermetilación del gen supresor tumoral APC en tejido mamario ([8598]). Por otro lado, en el presente trabajo el consumo de alcohol en enfermas se asoció de forma positiva a un mayor grado de metilación de los genes BRCA1 y ESR1 en tejido tumoral. En cáncer de mama, diferentes estudios han mostrado que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de este tipo de neoplasia, independientemente del tipo de bebida alcohólica y del estatus menopáusico ([6093]). Además, trabajos caso-control han asociado la ingesta de alcohol con un mayor grado de metilación de diversos genes, incluyendo ESR1 ([8618], [8619]) en tejido tumoral mamario, tal y como sugerirían los resultados obtenidos en este estudio.

En definitiva, estos resultados irían a favor del incremento de la metilación gen-específica, especialmente de BRCA1 y ESR1, tras un elevado consumo de proteínas, lípidos, donadores de grupos metilo y alcohol, mientras que la realización de actividad física podría disminuir la metilación de estos genes en glándula mamaria. Así, estos factores nutricionales y/o de estilo de vida podrían estar alterando el epigenoma del individuo, modulando consecuentemente el riesgo o susceptibilidad frente al desarrollo de cáncer de mama.

B. ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL

Los resultados obtenidos en el modelo experimental de cáncer de mama presentados en este trabajo han sido publicados en la revista científica “PLoS One” bajo el título “The Role of Dietary Extra Virgin Olive Oil and Corn Oil on the Alteration of Epigenetic Patterns in the Rat DMBA-Induced Breast Cancer Model” (Anexo 4).

1. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES TUMORALES

Resultados previos del equipo investigador obtenidos a través de un cribado mediante ADNc *Microarrays* identificó genes implicados en la carcinogénesis mamaria experimental e influenciados por las dietas hiperlipídicas empleadas en este estudio ([8657]), tales como genes supresores tumorales de la familia RASSF (“Ras association domain family”), TIMP3 (“Tissue Inhibitor of Metalloproteinasa 3”) y CDKN2c (“Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2C”). De hecho, la alteración del perfil de expresión génica es uno de los mecanismos de los efectos diferenciales de estas dietas hiperlipídicas en la carcinogénesis mamaria, siendo la dieta rica en PUFA n-6 claramente estimuladora ([1358], [3568], [3672], [4324]) y, débilmente promotora la dieta hiperlipídica de aceite de oliva ([3568], [5321], [7144]). Así, en el presente trabajo se ha validado y ampliado dicho estudio de expresión génica, analizando mediante Real-Time PCR la expresión de los genes RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c en diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria y en los tumores experimentales para, en último término, evaluar la implicación de la maquinaria epigenética como posible mecanismo a través del cual las dietas hiperlipídicas podrían estar modulando de forma diferencial la expresión génica.

Tal y como se ha descrito previamente, la proteína RASSF1A (“Ras association domain family 1 isoform A”) participa en la regulación de la dinámica de los microtúbulos, el ciclo celular y la apoptosis ([6237]). Por otro lado, el producto del gen TIMP3 posee la capacidad de inhibir las metaloproteinasas de la matriz extracelular, evitando así la degradación de dicha matriz y, por tanto, regulando la invasión tisular y la metástasis ([8669]). Y, por lo que respecta al gen CDKN2c, éste codifica para la proteína p18^{INK4C} que actúa como inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina CDK4, regulando así la progresión del ciclo celular.

En relación a los resultados obtenidos en **glándula mamaria**, los niveles de ARNm de RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c mostraron una gran variabilidad a lo largo del tiempo, observándose niveles de expresión fluctuantes durante la adolescencia (entre 36 y 51 días de edad) y hasta los 100 días de edad, así como un descenso generalizado en la etapa adulta (desde los 100 días hasta el final del ensayo). Las variaciones de expresión de dichos genes supresores tumorales detectadas durante la pubertad podrían estar relacionadas con la proliferación y diferenciación asociadas al desarrollo de la glándula mamaria en esta etapa. En este sentido, estudios “in vivo” e “in vitro” han demostrado un incremento en la expresión de diversos genes supresores tumorales, tales como BRCA1 y BRCA2, durante el desarrollo de

la glándula mamaria en la pubertad ([8428], [8670], [8671]). En relación al efecto de las dietas, las diferencias halladas entre grupos experimentales durante la adolescencia podrían deberse, al menos en parte, a que, tal y como ha sido descrito por el grupo investigador, las dietas hiperlipídicas, especialmente la rica en PUFA n-6, adelantarían el inicio de la pubertad, adquiriendo antes la maduración sexual ([6887]). Por otro lado, el descenso en la expresión génica de RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c detectado en la etapa adulta podría estar relacionado con el propio proceso del envejecimiento, fenómeno caracterizado por el incremento del silenciamiento transcripcional de genes supresores tumorales, favoreciendo así el desarrollo neoplásico ([8429]). Además, a los 100 y 246 días se ha de considerar que la glándula mamaria está inducida con DMBA (inducción a día 53), lo que podría también alterar la expresión de dichos genes supresores tumorales. En cuanto al efecto de las dietas, a excepción del gen CDKN2c que, en general, disminuyó su expresión en los grupos de dietas hiperlipídicas en todas las edades, las diferencias entre grupos experimentales se hallaron fundamentalmente al final del ensayo, detectándose una disminución de la expresión de RASSF1A en los grupos de aceite de oliva y de TIMP3 en Mp. Así, la disminución de la expresión de tales genes podría ser uno de los mecanismos, entre otros, a través de los que las dietas hiperlipídicas podrían favorecer el desarrollo neoplásico ([5321], [8353], [2568], [6887], [4736], [6879]). En este sentido, y pese a que son escasos los trabajos sobre la influencia de estas dietas en la expresión de genes supresores tumorales, en un modelo de cáncer de mama experimental realizado en ratones gestantes alimentados con dietas hiperlipídicas, se ha descrito una disminución de la expresión del gen supresor tumoral PTEN en el tejido glandular mamario de los descendientes, adquiriendo valores de expresión similares a los detectados en los tumores ([8672]).

Al analizar los **adenocarcinomas mamarios**, únicamente se hallaron diferencias entre grupos experimentales en relación a la expresión génica de RASSF1A y TIMP3. Se detectaron menores niveles de ARNm de RASSF1A en los grupos de aceite de oliva, mientras que la expresión de TIMP3 disminuyó, en general, en todos los grupos de dietas hiperlipídicas, significativamente en Mp, Oip y Op. A su vez, la comparación entre tejidos mostró una clara disminución de la expresión génica de RASSF1A y TIMP3 en los adenocarcinomas mamarios de todos los grupos experimentales. Sin embargo, en el caso de la expresión del gen CDKN2c dicha comparación no mostró diferencias entre glándula mamaria y tejido tumoral. Por otro lado, la expresión de los 3 genes supresores tumorales correlacionó positivamente entre sí tanto en glándula mamaria como en tumor, asociándose negativamente su expresión en tejido tumoral con los parámetros clínicos e histopatológicos analizados. Estos resultados podrían

poner de manifiesto la relevancia de los genes RASSF1A y TIMP3 en la carcinogénesis mamaria, dado que ambos genes han sido descritos como frecuentemente alterados en numerosas neoplasias, incluyendo la de mama ([8673], [8674]). En este sentido, las dietas hiperlipídicas, sobretodo la rica en MUFA n-9, disminuirían la expresión de RASSF1A y TIMP3 en glándula mamaria y tumor, contribuyendo al efecto que ambas dietas hiperlipídicas ejercen sobre la carcinogénesis mamaria experimental. Por lo que respecta al gen CDKN2c, también se ha descrito una disminución de su expresión en diversas neoplasias ([8675], [8676], [8677], [8678]). Sin embargo, los resultados publicados en relación al cáncer de mama sugieren que las alteraciones en los niveles de expresión de este gen son moderadamente raras en este tipo de neoplasia ([8679]). Por ello, y en vista de los resultados obtenidos, la pérdida de expresión del gen supresor tumoral CDKN2c en este modelo experimental podría no jugar un papel tan destacado en el desarrollo tumoral, como en otros tipos de cáncer.

2. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: METILACIÓN DEL ADN

Tal y como se ha comentado, existen evidencias de la influencia de las dietas hiperlipídicas en la alteración de la expresión de genes implicados en carcinogénesis mamaria ([8657]). Es por ello que, a partir de los resultados obtenidos en relación al efecto tanto de las dietas como de la propia enfermedad cancerosa en la expresión génica de RASSF1A y TIMP3, se consideró de interés evaluar la implicación de la maquinaria epigenética en la regulación de dicho proceso. Para ello, se estudiaron los principales mecanismos epigenéticos reguladores de la expresión génica: metilación del ADN (de forma global y gen-específica para RASSF1A y TIMP3) y modificaciones postraduccionales de las histonas.

2.1. Metilación global del genoma

En **glándula mamaria** los niveles de metilación global del ADN presentaron variaciones a lo largo del tiempo, observándose diferentes tendencias durante la fase de adolescencia (entre 23 y 51 días) y hasta los 100 días, y en la etapa adulta (desde los 100 días hasta el final del ensayo). Por lo que respecta a la adolescencia, se observó un descenso en los niveles de

metilación genómica a los 36 días sobretodo en los grupos control y Mip, y de forma más tenue en Oip. Esta disminución de la metilación global podría ser un reflejo de la elevada tasa de proliferación que presenta la glándula mamaria durante su desarrollo en este período, hecho que podría estar favoreciendo la desmetilación pasiva del ADN, proceso caracterizado por la pérdida de metilación durante la replicación del ADN. En este sentido, se ha descrito que durante la eritropoyesis se produciría una desmetilación global del genoma dependiente de la tasa de replicación del ADN ([8680]). Por otro lado, alrededor de la pubertad (36 y 51 días) los niveles de metilación genómica en Oip fueron mayores que en el resto de grupos. Esto podría ser debido al elevado contenido en compuestos minoritarios bioactivos, como escualeno y antioxidantes fenólicos, flavonoides y lignanos, presentes en el aceite de oliva virgen extra. ([7105], [4399]). Recientemente, un estudio epidemiológico ha descrito que los niveles de metilación global del ADN en leucocitos podrían correlacionar de forma positiva con la capacidad antioxidante de factores de la dieta ([8681]). También cabría destacar el mayor grado de metilación global (menor desmetilación) a 51 días de edad en el grupo Oip ya que se ha descrito esta edad como el momento de máxima vulnerabilidad de la glándula mamaria a la transformación neoplásica ([443], [6009]). Dado que la hipometilación global del ADN se ha asociado a inestabilidad cromosómica, transformación neoplásica y progresión tumoral ([8416]), los efectos del aceite de oliva virgen extra sobre la metilación global podrían estar disminuyendo, al menos en parte, la vulnerabilidad de la glándula mamaria a la transformación neoplásica. Estos resultados serían concordantes con los obtenidos previamente en la manifestación clínica de la carcinogénesis, ya que la dieta de aceite de oliva, a pesar de ser hiperlipídica, induciría un menor contenido tumoral, y tumores con un menor grado de malignidad morfológica que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz ([8353]). Por otro lado, durante la etapa adulta, se detectó una disminución progresiva de los niveles de metilación genómica de la glándula mamaria independientemente del grupo experimental. Estos resultados coinciden con otras evidencias publicadas en tejidos humanos que demuestran que el envejecimiento fisiológico está acompañado por cambios a nivel epigenético, entre ellos la pérdida gradual de la metilación global del genoma ([6262]). En este sentido, estudios realizados en rata también han descrito una disminución de la metilación global por efecto de la edad, sobretodo, en corazón y cerebro ([8682]). Además, trabajos realizados en ratas ACI han descrito una disminución en el grado de metilación global en glándula mamaria tras la inducción con radiación ionizante ([7938], [8425]). Por tanto, la reducción en los niveles de metilación global en esta etapa podría ser debida, principalmente, a una mayor desmetilación activa por efecto tanto de la edad como de la

inducción con DMBA. Este hecho podría deberse a que ambos factores (edad e inducción) podrían estar produciendo lesiones en el ADN, activando los sistemas de reparación BER (“Base excision repair”) y NER (“Nucleotide excision repair”) implicados en la desmetilación activa ([8497]). Además, la glándula mamaria durante la etapa adulta está diferenciada y, por tanto, la tasa de proliferación no es tan elevada, sugiriendo que la desmetilación pasiva es mucho menor que la que tiene lugar durante la pubertad.

Por lo que respecta a los **adenocarcinomas mamarios**, los grupos alimentados con dietas ricas en aceite de oliva presentaron los mayores niveles de metilación global, siendo este incremento significativo para Oip y cercano a la significación para Op en relación al control. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos en glándula mamaria en relación al posible efecto beneficioso que podrían ejercer los compuestos antioxidantes del aceite de oliva virgen extra sobre la metilación global. En este caso, en adenocarcinomas podría tener lugar tanto una elevada desmetilación pasiva, por la alta tasa de proliferación, como una elevada desmetilación activa, por efecto del propio proceso carcinogénico. En este sentido, ha sido descrito que tanto la familia proteica TET como las propias ADN metiltransferasas requieren de situaciones de alto estrés oxidativo para poder actuar como desmetilasas del ADN ([8497]). Por todo ello, los compuestos antioxidantes presentes en el aceite de oliva virgen extra, mediante la disminución del nivel de estrés oxidativo, podrían estar reduciendo la actividad desmetilasa de estas enzimas y, por tanto, la desmetilación activa del ADN, derivando en un mayor grado de metilación global. Por otro lado, en cáncer de mama, la metilación genómica se ha asociado inversamente con el grado histológico y con el estadio y tamaño tumoral ([8683]). Estos resultados también son compatibles con los obtenidos previamente en la caracterización del comportamiento clínico y anatomopatológico de estos tumores. Así, los grupos de dieta rica en aceite de oliva desarrollaron tumores de menor volumen y de bajo grado arquitectural y nuclear (I y II), de forma similar al control. En cambio, ambos grupos de dieta rica en aceite de maíz presentaron tumores mayoritariamente de grados II y III, y con mayor tamaño y actividad mitótica ([6887]).

Para evaluar la influencia del cáncer sobre la metilación genómica, se realizó la comparación entre tejidos obteniendo, paradójicamente, un aumento en el grado de metilación global en los adenocarcinomas mamarios respecto a la glándula mamaria en los grupos Oip y Op. Sin embargo, en el resto de grupos experimentales no se halló diferencias significativas entre glándula mamaria y tumor. Estos resultados fueron inesperados dado que la hipometilación global se considera uno de los “hallmarks” del cáncer a nivel epigenético ([8531]). Aunque se desconoce el significado de los resultados obtenidos, éstos podrían estar

relacionados con el hecho de que la glándula mamaria está inducida químicamente con DMBA, ya que existen evidencias que indican que la inducción alteraría los niveles de metilación global del genoma ([7938], [8425]).

2.2. Metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3

Tal y como se ha comentado previamente, los lípidos de la dieta afectan la expresión de genes relevantes en la carcinogénesis mamaria y descritos como frecuentemente metilados en cáncer, tales como RASSF1A y TIMP3 ([8657]). Así, se realizó el estudio del estado de metilación de dichos genes para evaluar la implicación de la maquinaria epigenética en los cambios de expresión detectados.

En cuanto al **estudio cualitativo de la metilación** del gen RASSF1A por “MSP”, en glándula mamaria, paradójicamente, se obtuvieron menores porcentajes de muestras metiladas en los grupos de dietas hiperlipídicas. Estos resultados podrían parecer contradictorios con los hallados en la bibliografía. Así, en un estudio realizado en un modelo murino de melanoma se ha descrito que las dietas hiperlipídicas estimulan la metilación del gen RASSF1A en tejido sano y tumoral ([8686]). Sin embargo, los datos obtenidos por “MSP” indican el porcentaje de muestras que presentan el alelo metilado y no el grado de metilación de la región promotora. Otra posible explicación podría ser que los dinucleótidos CpG analizados por “MSP” no fueran un buen reflejo de la metilación global del promotor del gen RASSF1A y, por tanto, de la relevancia de su metilación en cuanto al silenciamiento génico. Por estos motivos, se consideró de interés determinar de forma cuantitativa la metilación del gen RASSF1A mediante pirosecuenciación, tal y como se comentará más adelante. Por otro lado, en adenocarcinomas mamarios no se hallaron diferencias entre grupos experimentales en relación a la frecuencia de metilación de RASSF1A. Aún así, tal y como se esperaba, en todos los grupos se halló una mayor frecuencia de alelo metilado en tumor en comparación con la glándula mamaria. Pese a la carencia de datos en este modelo, en cáncer de mama humano se ha descrito un aumento en la frecuencia de metilación del gen RASSF1A en tejido tumoral en comparación con el tejido sano ([8685]). Además, al realizar la comparación unificando los valores de todos los grupos experimentales, se obtuvieron porcentajes en ambos tejidos (GM: 32,50%, T: 66,98%) similares tanto a los detectados por “MSP” en el estudio en humanos (GM: 40,45%, T: 79,78%) como a los descritos por otros autores ([8685]). Esto sugeriría que

RASSF1A podría ser uno de los genes frecuentemente metilados, no únicamente en cáncer de mama humano, sino también en el modelo de cáncer de mama inducido con DMBA.

Por lo que respecta al **estudio cuantitativo de la metilación** de los genes RASSF1A y TIMP3, todas las muestras analizadas de glándula mamaria y adenocarcinomas presentaron cierto grado de metilación en ambos genes, adquiriendo valores generalmente bajos. A su vez, la pequeña magnitud de variación entre muestras sugeriría que el grado de metilación gen-específica para un tejido en concreto, en este caso el tejido mamario, podría oscilar entre un rango determinado, de forma que pequeñas variaciones podrían implicar grandes cambios a nivel de expresión génica. En este sentido, un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama, también puso de manifiesto estas sutiles diferencias entre tejido sano y tumoral en cuanto al grado de metilación de diversos genes descritos como frecuentemente metilados en cáncer de mama ([8687]). En cuanto al efecto de los lípidos de la dieta, en glándula mamaria se halló un incremento en el grado de metilación de RASSF1A y TIMP3 en los grupos alimentados con dietas de aceite de maíz. Por su parte, en tejido tumoral la metilación de RASSF1A incrementó en todos los grupos de dietas hiperlipídicas, mientras que el grado de metilación de TIMP3 aumentó en los grupos de dieta de aceite de maíz, especialmente en Mip. Al realizar la comparación entre tejidos mamaros, en todos los grupos experimentales se observó un mayor grado de metilación de los genes RASSF1A y TIMP3 en tumor, en concordancia con la hipermetilación de estos genes supresores tumorales descrita en cáncer de mama humano ([6220], [8427]). Por otro lado, existen datos en la literatura que sugieren que las dietas hiperlipídicas podrían incrementar la metilación de genes supresores tumorales. Así, estudios en modelos animales de cáncer de mama y estudios epidemiológicos han descrito un aumento en la metilación de los genes CDH1 y RAR β 2 tras el consumo de dietas hiperlipídicas ([7003], [8594]). Además, los resultados obtenidos podrían sugerir que, a pesar de que ambas dietas (rica en PUFA n-6 y MUFA n-9) son hiperlipídicas, éstas podrían ejercer un efecto diferencial sobre la metilación gen-específica del ADN. En este sentido, las dietas ricas en aceite de maíz, descritas como claramente estimuladoras de la carcinogénesis mamaria ([1358], [3568], [3672], [4324]), podrían ejercer tales acciones, al menos en parte, a través del incremento de la metilación de los genes RASSF1A y TIMP3. Por el contrario, las dietas ricas en aceite de oliva virgen extra, a pesar de ser hiperlipídicas, no parecen estimular la metilación de estos genes supresores tumorales en glándula mamaria. Recientemente, ha sido descrito que el hidroxitirosol y la oleuropeína, los polifenoles mayoritarios del aceite de oliva virgen extra, son capaces de disminuir la metilación del gen supresor tumoral CB₁ (“cannabinoid receptor 1”), tanto en la línea celular de cáncer de colorectal Caco-2 como en

colon de rata ([8430]). Así, los polifenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra podrían ser los responsables, al menos en parte, de los efectos diferenciales de éstas dietas sobre la metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3. Por último, la falta de correlación, en general, entre el grado de metilación y de expresión génica de RASSF1A y TIMP3 podría sugerir la implicación de otros mecanismos epigenéticos en la regulación de su expresión. Además, dado que el silenciamiento epigenético de estos genes se considera un evento temprano en la carcinogénesis ([8696], [8697]), los niveles de metilación detectados al final del ensayo podrían no reflejar el grado de malignidad tumoral.

2.3. Caracterización de las enzimas ADN metiltransferasas

Con el fin de estudiar los mecanismos epigenéticos implicados en las alteraciones detectadas a nivel de metilación del ADN (global y gen-específica), se determinaron tanto los niveles de expresión génica de las ADN metiltransferasas con actividad enzimática (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b), como su actividad enzimática total.

Por lo que respecta a la **expresión génica de ADN metiltransferasas**, a lo largo de todo el ensayo y en ambos tejidos (glándula mamaria y tumor) se detectó una mayor expresión de DNMT1 en comparación con los niveles de ARNm de las ADN metiltransferasas *de novo* (DNMT3a y DNMT3b). Estos resultados estarían en concordancia con la literatura ya que ha sido descrito que la isoforma de ADN metiltransferasa más abundante es DNMT1, implicada en el mantenimiento del patrón de metilación del ADN durante la replicación ([8688]). Además, tal y como otros autores han descrito, los resultados obtenidos mostraron una expresión génica coordinada entre las tres isoformas en ambos tejidos ([8431]).

En relación a los niveles de ARNm en glándula mamaria, en general, se observaron fluctuaciones a lo largo del tiempo con un descenso en la expresión de las tres isoformas al final del ensayo. En cuanto a la adolescencia, a 51 días de edad se detectó un incremento significativo de expresión génica de DNMT3a en todos los grupos experimentales, siendo Mip el que presentó los mayores niveles. Esto podría estar relacionado con la proliferación y diferenciación asociadas al desarrollo de la glándula mamaria que tiene lugar en este periodo ([7671]). Por otro lado, el descenso observado en la expresión de las tres isoformas en la etapa adulta podría ser debido al efecto de la edad. En este sentido, estudios en animales y en humanos han descrito que la expresión génica de estas enzimas varía con el envejecimiento, de tal manera que con el paso del tiempo disminuiría la expresión de DNMT1 (favoreciendo

la hipometilación global) y DNMT3a, mientras que se incrementarían los niveles de ARNm de DNMT3b (principal responsable de la hipermetilación gen-específica asociada al envejecimiento) ([8689]). En relación al efecto de la dieta, en glándula mamaria los resultados mostraron, en general, un incremento en la expresión de las tres isoformas a 100 días de edad en los grupos de dieta de aceite de oliva, mientras que al final del ensayo dichos niveles disminuyeron en Oip y aumentaron en Mip. Por su parte, en adenocarcinomas mamarios se observó un descenso en la expresión de DNMT3a en los grupos de aceite de oliva, y de DNMT3b en todos los grupos de dietas hiperlipídicas excepto en Mp. Pese a que ha sido descrito un incremento de expresión génica de las tres isoformas en diversos tipos de cáncer, incluyendo el de mama ([8689]), la comparación entre tejidos mamarios mostró, paradójicamente, una mayor expresión génica de DNMT3a y DNMT3b en glándula mamaria. Ha sido descrito que la acción ejercida por DNMT3b es la más relevante en la metilación gen-específica ([7021]). El gen DNMT3b se expresa en forma de diversos transcritos mediante “splicing” alternativo ([7021]), y no todos ellos presentan actividad ADN metiltransferasa debido a la pérdida del dominio catalítico C-terminal ([7021]). Si bien la sonda empleada en el análisis por “Real-Time PCR” amplifica una región conservada en todos los transcritos, la proporción de transcritos con actividad enzimática podría no ser la misma entre los distintos grupos experimentales. Además, se han descrito diversos miRNAs implicados en la regulación postranscripcional de los niveles de ARNm de las ADN metiltransferasas. A modo de ejemplo, miRNA-148, miRNA-152 y miRNA-126, entre otros, promoverían la degradación del ARNm de DNMT1, disminuyendo sus niveles proteicos. Del mismo modo, la familia miRNA-29 estaría implicada en la degradación del ARNm de las ADN metiltransferasas *de novo* ([8690]). Por otro lado, también han sido descritas una serie de modificaciones postraduccionales (acetilación, ubiquitinización, metilación, fosforilación, etc.) que influirían en la funcionalidad de las ADN metiltransferasas, alterando sus propiedades catalíticas, estabilidad e interacción con otras proteínas ([8690]). Por todo ello, y en base a los resultados obtenidos, los niveles de ARNm detectados podrían no reflejar el grado de actividad enzimática ADN metiltransferasa en este modelo experimental. En consecuencia, se consideró de interés ampliar este estudio con la determinación de la actividad enzimática de las ADN metiltransferasas.

En referencia a la **actividad ADN metiltransferasa total**, los resultados obtenidos en glándula mamaria al final del ensayo mostraron un incremento de dicha actividad en todos los grupos de dietas hiperlipídicas excepto en Op, siendo el grupo Mip el que obtuvo los mayores niveles. A su vez, en adenocarcinomas mamarios el grupo Mip también fue el que destacó por

presentar el mayor grado de actividad respecto al resto de grupos. Por su parte, la comparación entre tejidos mostró un incremento de la actividad ADN metiltransferasa en tumor en relación a la glándula mamaria en todos los grupos experimentales, en concordancia con la literatura ([7021]). Por otro lado, existen evidencias que indican que DNMT3b es la isoforma que ejerce el papel más relevante en la tumorigénesis mamaria ([7021]). Así, estos resultados podrían sugerir que las variaciones detectadas en los niveles de actividad enzimática total podrían deberse, en su mayoría, a cambios en el grado de actividad de DNMT3b, isoforma implicada en la metilación gen-específica ([8540]), de tal forma que un aumento de actividad catalítica podría estar indicando una mayor metilación génica. En este sentido, en glándula mamaria y tumor el grupo Mip, que presentó los mayores niveles de actividad enzimática ADN metiltransferasa, también mostró un mayor grado de metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3 en comparación con el grupo control. Asimismo, en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz se obtuvieron, en general, correlaciones positivas entre la actividad ADN metiltransferasa total y el grado de metilación génica de RASSF1A y TIMP3 en glándula mamaria, mientras que en tejido tumoral dicho parámetro únicamente correlacionó con la metilación de TIMP3 en el grupo Mip. Por otra parte, el hecho de que los grupos alimentados con dieta hiperlipídica desde el destete (Mip y Oip) presentasen mayor actividad en relación a los grupos alimentados con ellas después de la inducción (Mp y Op, respectivamente), puso de manifiesto la influencia que puede tener, no sólo el tipo de lípido, sino también el momento y duración de la administración de dichas dietas, sobre los niveles de actividad enzimática ADN metiltransferasa.

Por último, los resultados obtenidos en este modelo experimental parecerían indicar que los adenocarcinomas mamarios presentarían un mayor grado de actividad enzimática ADN metiltransferasa, pese a mostrar menor expresión génica de DNMT3a y DNMT3b en relación a la glándula mamaria. Esto podría evidenciar la relevancia de las modificaciones tanto postranscripcionales como postraduccionales a las que están sometidas estas isoformas enzimáticas ([8690]), lo cual estaría asociado con la falta de correlación, en general, entre expresión génica de las tres isoformas enzimáticas y grado de actividad ADN metiltransferasa.

En definitiva, los resultados obtenidos sugerirían que los lípidos de la dieta ejercerían un efecto diferencial sobre el grado de actividad ADN metiltransferasa en ambos tejidos. En este contexto, la dieta rica en PUFA n-6 incrementaría dicha actividad enzimática en glándula mamaria y tejido tumoral, mientras que la dieta rica en aceite de oliva, a pesar de ser hiperlipídica, únicamente aumentaría la actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria, adquiriendo en cualquier caso valores inferiores en ambos tejidos a los del grupo Mip. Así, el

aceite de oliva virgen extra podría ejercer algún efecto beneficioso que contrarestase el hecho de que la dieta administrada es hiperlipídica. En este sentido, diversos estudios han demostrado que determinados compuestos bioactivos del aceite de oliva, entre ellos los polifenoles y las flavonas, podrían actuar como potentes agentes inhibidores tanto de la expresión como de la actividad de las ADN metiltransferasas ([8565], [8691], [8692]). Por otro lado, el incremento de actividad ADN metiltransferasa estaría relacionado con un aumento de la metilación gen-específica. En el caso concreto de RASSF1A y TIMP3, los datos sugieren que su hipermetilación sería un evento temprano, pudiendo estar más influido por el efecto del cáncer que por el de la dieta, y su grado de metilación no correspondería a su expresión génica. A pesar de ello, sería de esperar que un incremento de la metilación gen-específica en los animales alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz estuviese afectando a otros genes, en concordancia con la disrupción del perfil de expresión génica hallado en dichos animales ([8657]). Así, éste sería uno de los mecanismos a través de los que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz ejercería sus efectos claramente estimuladores, a diferencia de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra, sobre el cáncer de mama experimental.

3. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE MECANISMOS EPIGENÉTICOS: MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la interacción entre la maquinaria de metilación del ADN y la responsable de las modificaciones postraduccionales de las histonas en la regulación de la expresión génica ([8515]). Además, en diversas patologías, incluyendo el cáncer, se han descrito alteraciones que afectan a ambas maquinarias. Es por ello que, dado el carácter reversible de tales aberraciones y su influencia por factores nutricionales ([8489]), se consideró de interés evaluar los efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles globales de cuatro modificaciones de histonas comúnmente alteradas en cáncer de mama (H3K4me2, H3K27me3, H4K20me3 y H4K16ac) ([8419], [8420], [8421]).

En glándula mamaria los resultados obtenidos mostraron una disminución en los niveles globales de H3K27me3 en el grupo Mip así como de H4K16ac en Oip, mientras que en tejido tumoral el grupo Op presentó menores niveles de H4K20me3 respecto al resto de grupos. En

general, los niveles totales de las cuatro modificaciones de histonas disminuyeron en tejido tumoral respecto a la glándula mamaria, especialmente los de H3K27me3, H4K20me3 y H4K16ac, tal y como ha sido descrito por otros autores ([8419], [8420], [8421]), sugiriendo que la pérdida de estas modificaciones de histonas también jugaría un papel relevante en la carcinogénesis mamaria experimental. En este contexto, en 2005 Fraga y colaboradores propusieron como “hallmark” del cáncer a nivel epigenético la pérdida tanto de H4K16ac como de H4K20me3, estando ambas modificaciones también consideradas eventos tempranos en la carcinogénesis ([8419]). Por otro lado, en la literatura existen pocas evidencias del efecto de factores de la dieta en las modificaciones postraduccionales de las histonas. Pese a ello, un estudio en ratas gestantes ha puesto de manifiesto que la suplementación con colina disminuye los niveles globales de H3K4me2 e incrementa los de H3K27me3 en hígado y cerebro de los descendientes ([8693]). Otro trabajo realizado también en ratas ha descrito que la deficiencia dietética en donadores de grupos metilo disminuye de forma progresiva los niveles totales de H4K16ac y H4K20me3 durante el transcurso de la carcinogénesis hepática ([8695]). En cuanto a los lípidos de la dieta, son escasos los datos publicados sobre su influencia a nivel de modificaciones de histonas, centrándose fundamentalmente en genes del metabolismo. Así, trabajos realizados en ratas han descrito que la ingesta materna de dietas hiperlipídicas disminuiría los niveles de H3K4me2 y H3K27me3 en la región promotora del gen PCK1 (“Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1”) en el hígado de los descendientes ([8694]). En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio sugerirían que ambas dietas hiperlipídicas alterarían los patrones de modificaciones postraduccionales de las histonas. Así, la dieta rica en aceite de maíz disminuiría los niveles globales de H3K27me3 en glándula mamaria, mientras que la dieta de aceite de oliva reduciría los niveles de H4K16ac en glándula mamaria y los de H4K20me3 en tumor. La disminución de los niveles globales de estas modificaciones de histonas ha sido relacionada con un peor pronóstico clínico en cáncer de mama ([8420], [8421], [8546]). De hecho, en este estudio los niveles de H4K20me3 en tumor correlacionaron negativamente con los parámetros histopatológicos de los tumores. Aunque la relevancia específica de las modificaciones de histonas probablemente dependa de los genes en los que se encuentran, regulando por tanto su expresión génica, los resultados indican la influencia que pueden tener sobre tales modificaciones los factores dietéticos, concretamente los lípidos de la dieta, sugiriendo que la alteración del patrón de histonas formaría parte de los efectos estimuladores de ambas dietas hiperlipídicas sobre la carcinogénesis mamaria experimental.

C. BALANCE INTEGRADO DE LOS RESULTADOS

El cáncer de mama es una enfermedad con elevada incidencia, prevalencia y mortalidad que puede estar influida por factores nutricionales, entre los que destacan los lípidos de la dieta. A su vez, en cáncer se han descrito alteraciones de los patrones epigenéticos caracterizadas por ser de carácter reversible y, por tanto, susceptibles de ser modificadas por factores ambientales ([8489]). Así, el objetivo del presente trabajo ha sido definir cambios epigenéticos implicados en la génesis del cáncer de mama humano y experimental, así como determinar si el estilo de vida, y especialmente los hábitos dietéticos en relación al consumo de lípidos, influyen en este tipo de neoplasia a través de la alteración de patrones epigenéticos. Dicho objetivo se ha desarrollado en dos líneas de investigación, una en cáncer de mama humano y otra en cáncer de mama experimental. El estudio en humanos se ha llevado a cabo en muestras de sangre periférica de mujeres sanas y en sangre periférica, glándula mamaria y tumor de pacientes de cáncer de mama. En ambas poblaciones, sanas y enfermas, se realizó una caracterización de los sujetos de estudio mediante el análisis de parámetros reproductivos, antropométricos así como de estilo de vida a partir de cuestionarios (frecuencia de consumo de alimentos, adherencia a la dieta mediterránea y actividad física). Por su parte, el estudio experimental se ha desarrollado en el modelo de cáncer de mama inducido con DMBA en la rata Sprague-Dawley, a partir de muestras de glándula mamaria y tumor de animales alimentados con diferentes dietas hiperlipídicas (rica en aceite de maíz o rica en aceite de oliva).

Por lo que respecta al **efecto del cáncer** sobre los patrones epigenéticos, los resultados obtenidos, tanto en el estudio en humanos como en el modelo experimental, mostraron un claro incremento de la metilación gen-específica en tumor respecto a glándula mamaria, siendo éste estadísticamente significativo para la mayoría de los genes analizados, y en concordancia con la disrupción epigenética que tiene lugar durante la transformación y el desarrollo del cáncer de mama. La metilación del ADN se ha descrito como un proceso epigenético de gran relevancia a nivel gen-específico debido a su implicación en la regulación de la expresión génica, estando asociada la metilación de las regiones promotoras con silenciamiento génico ([8491]). En línea con el silenciamiento de genes supresores tumorales, en el estudio experimental se ha observado una disminución de la expresión génica de RASSF1A y TIMP3 en tejido tumoral en relación a la glándula mamaria, correlacionando negativamente su expresión génica en tumor con parámetros clínicos e histopatológicos tumorales. Estos resultados evidenciarían la relevancia del silenciamiento de dichos genes

supresores tumorales en la carcinogénesis mamaria. Sin embargo, los resultados de este estudio no mostraron correlaciones significativas entre el grado de metilación y de expresión génica de RASSF1A y TIMP3, sugiriendo la implicación de otros mecanismos epigenéticos en la regulación de su expresión ([7021]). En cuanto a la metilación gen-específica, los resultados del estudio en humanos sugieren que, de los 12 genes evaluados e implicados en las capacidades adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo neoplásico (“hallmarks” del cáncer) ([7349]), los genes RAR β 2, PRB, RASSF1A, NES1, TWIST1, CDH1, HLA-A y ESR1 ejercerían funciones relevantes en la carcinogénesis mamaria humana dado el incremento en la frecuencia de metilación detectado en tejido tumoral. Así, en las células tumorales, la alteración de los patrones de metilación de dichos genes conllevaría la adquisición de un fenotipo celular más maligno, caracterizado por la desregulación del ciclo celular, una mayor capacidad de evasión del sistema inmune y capacidad invasiva y metastásica. Por su parte, en el estudio en animales la frecuencia de metilación del gen RASSF1A y de TIMP3 fue significativamente superior en tejido tumoral respecto a la glándula mamaria. A pesar de que no existen datos en este modelo experimental, estos resultados están en línea con datos publicados en humanos ([6220], [8427]). Por otro lado, los resultados no sólo de la frecuencia, sino también del grado de metilación de los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A destacan la importancia de dichos genes en el desarrollo tumoral. Sin embargo, la falta de correlación en tejido tumoral entre los parámetros histopatológicos y el grado de metilación de estos genes sugiere que la hipermetilación de los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A en cáncer de mama humano, así como de RASSF1A y TIMP3 en cáncer de mama experimental, podría ser un evento temprano de la carcinogénesis mamaria, tal y como han sugerido otros autores ([8774], [8760], [8696], [8697]), de forma que la metilación de sus regiones promotoras no reflejaría el grado de malignidad tumoral en fases muy posteriores.

Existen numerosos estudios basados en determinar el efecto del cáncer en los patrones de metilación de otros tejidos, como sería el caso de la sangre periférica (ADN leucocitario), con la finalidad de definir cambios epigenéticos que covarien con la enfermedad y que permitan establecer perfiles de metilación asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar determinados tipos de neoplasias ([7555], [8730]). Asimismo, el estudio de tejido no tumoral en voluntarias sanas y enfermas podría determinar patrones epigenéticos que se asocien a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. En este contexto, los datos obtenidos hasta el momento en el estudio en humanos en sangre periférica sugieren que, del panel de 12 genes, los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A podrían ser candidatos a biomarcadores de riesgo o susceptibilidad de cáncer de mama humano, dado que su frecuencia (BRCA1 y RASSF1A) y

grado de metilación (BRCA1 y ESR1) en ADN leucocitario es superior en enfermas que en sanas. Tampoco se puede descartar que este incremento sea consecuencia del proceso neoplásico, donde el perfil de metilación de dichos genes en leucocitos podría covariar con la enfermedad. En este sentido, se ha descrito que el proceso canceroso ejerce una influencia sobre las subpoblaciones de leucocitos ([8733], [8788]), derivando en cambios en el grado de metilación génica detectado en sangre periférica ya que los patrones de metilación varían en función de las proporciones de células sanguíneas circulantes ([8734], [8736], [8737]).

En cáncer de mama, diversos parámetros asociados a la reproducción han sido relacionados con el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia, tales como la nuliparidad, una primera gestación tardía, la menarquia precoz y la menopausia tardía ([3950], [3966], [5975]). En este sentido, en el estudio en humanos los resultados obtenidos mostraron correlaciones positivas entre el grado de metilación de los genes BRCA1 y ESR1 en todos los tejidos en general y la edad en la primera gestación y de aparición de la menopausia. Esto sugeriría que dichos factores asociados a la reproducción podrían estar modulando el riesgo o susceptibilidad individual frente al desarrollo de cáncer de mama, en parte, a través de la alteración del epigenoma del tejido mamario.

Otros factores relacionados con el estilo de vida, como el consumo de alcohol y la realización de actividad física, también han sido asociados con el riesgo de cáncer de mama. Así, mientras que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de este tipo de neoplasia, independientemente del tipo de bebida alcohólica y del estatus menopáusico ([6093]), el ejercicio físico moderado ha mostrado una asociación inversa con el riesgo de cáncer de mama, sobretodo en mujeres postmenopáusicas ([6093]). En este contexto, los resultados obtenidos en el estudio en humanos mostraron que el consumo de alcohol conllevaría un aumento de la metilación gen-específica, sobretodo de los genes BRCA1 y ESR1, mientras que la realización de ejercicio físico disminuiría el grado de metilación de dichos genes en glándula mamaria, pudiendo ser éste, entre otros, uno de los mecanismos a través de los que dichos factores modularían el riesgo de cáncer de mama humano.

Uno de los mecanismos que se ha postulado como responsable del incremento de la metilación gen-específica en cáncer sería el aumento de la actividad enzimática ADN metiltransferasa ([8541]). En este sentido, los resultados obtenidos en el modelo experimental mostraron un aumento de la actividad ADN metiltransferasa en tumor en relación a la glándula mamaria, en concordancia con el incremento de la metilación gen-específica en tejido tumoral. De hecho, en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de maíz, el grado de metilación de RASSF1A y TIMP3 se asoció positivamente con la actividad ADN

metiltransferasa. Por otro lado, la menor expresión génica de DNMT3a y DNMT3b en tejido tumoral sumado a la falta de correlación, en general, entre expresión génica de las tres isoformas y actividad ADN metiltransferasa, evidenciaría la relevancia de las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales a las que están sometidas estas isoformas enzimáticas ([8690]).

En cáncer no únicamente se producirían alteraciones de los patrones de metilación a nivel gen-específico, sino que también tendría lugar un descenso generalizado del grado de metilación global del ADN ([8531]). En este contexto, los resultados obtenidos en el estudio en humanos, mediante el análisis de secuencias repetitivas LINE-1, mostraron una disminución del grado de metilación genómica en tejido tumoral en comparación con la glándula mamaria. Esta hipometilación global en tumor conllevaría la promoción de fenómenos de inestabilidad cromosómica, la reactivación de elementos transponibles y la pérdida de impronta ([8531]). Paradójicamente, en el modelo experimental los datos obtenidos no mostraron una disminución de la metilación genómica en tejido tumoral en relación a la glándula mamaria. De hecho, en los grupos de dieta hiperlipídica de aceite de oliva se observó un incremento del grado de metilación global en tumor, desconociéndose su significado. No obstante, estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que la glándula mamaria estaba inducida químicamente con DMBA, ya que se ha descrito un descenso de la metilación genómica en tejidos que han sufrido un insulto carcinogénico ([7938], [8425]). Por otro lado, en sangre periférica la metilación global del ADN leucocitario no reflejó el descenso de metilación detectado en tejido tumoral. De hecho, se detectó un mayor grado de metilación genómica en sangre periférica de enfermas en relación a las voluntarias sanas. A pesar de que este parámetro, por tanto, no parece covariar con los cambios moleculares tumorales, sí podría reflejar otros cambios que acontecen con la enfermedad, tales como la alteración de las subpoblaciones de leucocitos circulantes. En este sentido, se ha descrito que el grado de metilación de secuencias LINE-1 se asociaría positivamente con el porcentaje de neutrófilos y de manera negativa con el de linfocitos ([8616]), de forma que una disminución en la población de linfocitos, respecto a las células mieloides, por efecto del proceso neoplásico sería compatible con un incremento de la metilación de LINE-1 en ADN leucocitario de enfermas.

Otro evento epigenético frecuentemente alterado en cáncer son las modificaciones postraduccionales de las histonas. Así, el estudio de los niveles globales de H3K4me2, H3K27me3, H4K20me3 y H4K16ac en el modelo experimental mostró una disminución de dichas modificaciones en tejido tumoral, especialmente en el caso de H3K27me3, H4K20me3

y H4K16ac. Aunque los trabajos sobre modificaciones de histonas en este modelo son escasos, los resultados obtenidos son compatibles con datos publicados por otros autores en cáncer de mama humano ([8419], [8420], [8421]). Así, estos resultados sugerirían que la pérdida de estas modificaciones también jugaría un papel relevante en cáncer de mama experimental, asociándose además de forma negativa los niveles de H4K20me3 en tejido tumoral con parámetros histopatológicos de los tumores.

En cuanto al **efecto de la dieta** en general, y concretamente de los lípidos, diversos estudios tanto epidemiológicos como experimentales han descrito asociaciones entre varios factores nutricionales y el riesgo de cáncer de mama. A nivel epidemiológico, numerosos trabajos han relacionado positivamente el aporte calórico de las dietas y el elevado consumo de grasas, independientemente del tipo, con el riesgo de este tipo de neoplasia ([868], [920], [6321]). En relación también a los lípidos, los estudios experimentales han mostrado claramente una acción estimuladora de la carcinogénesis mamaria por parte de los ácidos grasos saturados ([920], [1486], [3205]), así como de los poliinsaturados n-6 en general ([1358], [3568], [3672], [4324]), mientras que los poliinsaturados n-3 serían inhibidores del crecimiento tumoral mamario y la metástasis ([1486], [3568], [3615], [4324], [4353]). En referencia a los ácidos grasos monoinsaturados, fundamentalmente el ácido oleico, se ha observado desde un efecto no promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama ([3568], [5321], [7144]). Estos datos están de acuerdo con resultados previos obtenidos en las mismas muestras experimentales utilizadas en el presente estudio, donde se observó un claro efecto estimulador del cáncer de mama inducido con DMBA de las dietas ricas en poliinsaturados n-6, y un efecto débilmente promotor de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra ([6887]). Por otro lado, numerosos componentes de la dieta que desempeñan un papel protector frente al desarrollo de cáncer, ejercerían tales acciones, en parte, mediante la modulación del epigenoma, como sería el caso de los isotiocianatos ([8570], [8571], [8572]), el licopeno ([8582]) y los polifenoles como la epigallocatequina-3-galata (EGCG) ([8565]), el resveratrol ([8567]), la curcumina ([8415]) y la genisteína ([8568], [8569]).

En el presente trabajo se ha observado la influencia de diversos factores dietéticos sobre los patrones epigenéticos. Así, en el estudio en humanos se hallaron correlaciones positivas entre la metilación gen-específica, especialmente de BRCA1 y ESR1, y la ingesta de energía total, proteína, lípidos totales, ácidos grasos saturados y vitaminas B₂, B₆ y B₁₂. En el caso de las vitaminas, estos resultados podrían estar relacionados con que dichas vitaminas son donadores de grupos metilo y, consecuentemente, podrían estar incrementando la formación de SAM, favoreciendo así la metilación del ADN ([8558]). Por otro lado, la ingesta elevada de

energía total ([868], [920]), proteína ([8645], [8646]), ([8647]), lípidos totales ([6321]) y saturados ([920], [1486], [3205]) se ha relacionado con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama. En este contexto, los resultados obtenidos sugerirían que estos factores nutricionales podrían estar influyendo sobre el riesgo de este tipo de neoplasia, al menos en parte, a través de la alteración de los patrones epigenéticos. En relación a los lípidos, tanto en el estudio en humanos como en el modelo experimental los resultados pusieron de manifiesto la importancia de la cantidad de grasa total así como del tipo de lípido consumido. Así, en humanos, tal y como se ha comentado, se hallaron correlaciones positivas entre la ingesta de lípidos totales y la metilación génica de BRCA1 y ESR1. Por su parte, en el estudio en animales las dietas hiperlipídicas, independientemente del tipo (ricas en aceite de maíz o en aceite de oliva), disminuyeron la expresión génica de RASSF1A y TIMP3 en glándula mamaria y tumor, incrementaron el grado de metilación de RASSF1A en tejido tumoral, y alteraron los patrones de las modificaciones postraduccionales de las histonas. Estos datos estarían de acuerdo con un efecto estimulador del exceso de lípidos sobre el desarrollo del cáncer de mama, modificando patrones epigenéticos que alterarían la expresión de genes supresores tumorales. Por otro lado, los resultados de este trabajo también sugerirían que, para una misma cantidad de lípido ingerida, el factor fundamental es el tipo de lípido. Esto estaría en concordancia con la asociación positiva hallada en el estudio en humanos entre el consumo de ácidos grasos saturados y el grado de metilación gen-específica. A pesar de que no se han hallado datos de la influencia de los ácidos grasos saturados sobre los patrones de metilación de genes relevantes en cáncer, en la literatura diversos estudios han descrito el efecto de dichos ácidos grasos en la metilación de genes implicados en metabolismo ([8584], [8585], [8586]). Así, trabajos experimentales han puesto de manifiesto que la exposición prenatal a diferentes ácidos grasos saturados induce hipermetilación del promotor del gen FADS2 ([8586]). En cuanto al modelo experimental, se observó un efecto diferencial de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz (rica en ácidos grasos poliinsaturados n-6) y de la dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra (rica en ácidos grasos monoinsaturados n-9 y compuestos bioactivos). Así, la dieta rica en aceite de maíz mostró un claro incremento de la metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3 en glándula mamaria y tumor, probablemente relacionado con el aumento de la actividad ADN metiltransferasa detectado en ambos tejidos. Aunque la metilación de RASSF1A y TIMP3 no correlacionó con su expresión génica, tal y como se ha comentado, el silenciamiento epigenético de estos genes podría ser un evento temprano relevante en la carcinogénesis mamaria, estando por tanto más influido por el propio proceso neoplásico que por los factores dietéticos. A pesar de ello, los resultados

sugieren que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, a diferencia de la dieta rica en aceite de oliva, incrementaría la actividad ADN metiltransferasa, aumentando consecuentemente la metilación gen-específica de otros genes quizás también relevantes en la carcinogénesis mamaria, siendo éste uno de los mecanismos del efecto claramente estimulador de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz sobre la carcinogénesis mamaria experimental. Por su parte, la dieta rica en aceite de oliva, a pesar de ser hiperlipídica, no incrementó la metilación de RASSF1A en glándula mamaria, ni la de TIMP3 en glándula mamaria y tumor, así como tampoco modificó la actividad ADN metiltransferasa en el tejido neoplásico. Además, la dieta hiperlipídica de aceite de oliva aumentó el grado de metilación global del ADN no sólo en tejido tumoral, sino también en glándula mamaria a 51 días de edad, hecho que podría estar disminuyendo la vulnerabilidad de la glándula mamaria a la transformación neoplásica ([443], [6009]). De hecho, estudios previos realizados en estos mismos animales indicaron una disminución del rendimiento de la carcinogénesis (incidencia y contenido tumoral total) en los animales alimentados con esta dieta hiperlipídica de aceite de oliva en comparación con los alimentados con la dieta hiperlipídica de aceite de maíz. Así, el global de estos resultados sugiere, en la dieta hiperlipídica de aceite de oliva, algún efecto beneficioso por parte de este tipo de aceite que contraresta parcialmente el hecho de ser una dieta hiperlipídica. En este sentido, determinados componentes bioactivos del aceite de oliva virgen extra, tales como los polifenoles y/o las flavonas, han sido descritos como potentes inhibidores de la actividad ADN metiltransferasa ([8565], [8691], [8692]). Además, los antioxidantes del aceite de oliva virgen extra reducirían los niveles de estrés oxidativo y, consecuentemente, disminuirían la actividad desmetilasa de la familia proteica TET y de las ADN metiltransferasas, derivando en una menor desmetilación activa del ADN ([8497]).

En conclusión, pese a que es necesario ser prudente a la hora de extrapolar al cáncer de mama humano resultados obtenidos en modelos experimentales, las evidencias halladas en este trabajo sugieren que la influencia que ejerce la propia enfermedad sobre el epigenoma alteraría mecanismos epigenéticos comunes, en términos generales, entre el cáncer de mama humano y el experimental. Estas alteraciones se caracterizarían, entre otras, por el incremento de la metilación gen-específica asociado a un aumento de la actividad ADN metiltransferasa, la disminución de la expresión de genes supresores tumorales y la alteración de modificaciones postraduccionales de las histonas. Estos cambios, además, podrían estar influidos por factores dietéticos y de estilo de vida, como el consumo de alcohol, la realización de actividad física, la ingesta calórica total así como de proteínas y vitaminas B₂, B₆ y B₁₂ y, especialmente, de lípidos (tanto en cantidad total como en función del tipo).

Asimismo, la influencia de éstos y otros factores de riesgo relacionados con la reproducción sobre el desarrollo de cáncer de mama, tales como la edad en la primera gestación y de aparición de la menopausia, podría ser, entre otros mecanismos, a través de la alteración de los patrones epigenéticos. El interés de hallar que determinados factores de riesgo, incluido el estilo de vida, alteran dichos patrones se basa en que los mecanismos epigenéticos, a diferencia de los genéticos, son modificables. Así, los resultados del presente trabajo permiten formular opiniones científicas sobre la importancia que tienen los hábitos dietéticos y el estilo de vida en relación a la salud pública o al riesgo de enfermedad. En este sentido, se podrían definir factores de riesgo y/o protectores a los que está sometida la población en base a sus hábitos alimenticios en relación al consumo de grasas. Por todo ello, este trabajo en su conjunto se enmarcaría en el campo de la prevención primaria y secundaria del cáncer de mama.

..... **C**ONCLUSIONES **■**

A. ESTUDIO EN HUMANOS

- 1. De la caracterización de los sujetos de estudio en la población de voluntarias sanas y de enfermas de cáncer de mama mediante el análisis de parámetros reproductivos y antropométricos:**
 - 1.1.** Los parámetros reproductivos de edad de aparición de la menarquia y de la menopausia, número de embarazos, edad en la primera gestación y práctica de lactancia materna no difieren entre ambas poblaciones.
 - 1.2.** Las enfermas de cáncer de mama son de mayor edad, correspondiendo en su mayoría a mujeres postmenopáusicas con mayor índice de masa corporal y de ratio cintura-cadera.

- 2. De la caracterización del estilo de vida y los hábitos dietéticos de las voluntarias sanas y de las pacientes con cáncer de mama:**
 - 2.1.** De la evaluación de dichos hábitos a través de cuestionarios:
 - 2.1.1.** Las enfermas de cáncer de mama muestran una mayor ingesta diaria de lípidos totales, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados totales, así como del tipo omega 6 y 3 de origen no marino, aceite de oliva, fibra y vitamina B₉.
 - 2.1.2.** Tanto sanas como enfermas presentan un grado medio de adherencia a la Dieta Mediterránea, hecho que pone de manifiesto la necesidad de mejorar los patrones alimenticios de ambas poblaciones.
 - 2.1.3.** Las voluntarias sanas presentan una mayor ingesta de alcohol y realización de actividad física en relación a las enfermas, pudiendo ser debido a la influencia de la edad en el estilo de vida de la población, aunque tampoco se puede descartar la influencia de la enfermedad.
 - 2.2.** De la determinación de marcadores bioquímicos en sangre periférica que reflejen la ingesta lipídica:
 - 2.2.1.** Los ácidos grasos que conforman las membranas eritrocitarias corresponden en un 46% a saturados, un 24% a monoinsaturados, un 25% a poliinsaturados del tipo omega 6 y el 5% restante a omega 3.
 - 2.2.2.** El perfil de ácidos grasos de dichas membranas varía entre sanas y enfermas, probablemente debido tanto a la influencia de los diferentes hábitos dietéticos

en relación al consumo de grasas, como a las alteraciones en el metabolismo lipídico que podrían producirse como consecuencia del proceso neoplásico.

- 2.2.3.** La cantidad de ácido margárico (C17:0) en la membrana eritrocitaria podría ser un buen reflejo del consumo de ácidos grasos saturados, mientras que los niveles de ácido docosadienoico (C22:2) y eicosapentanoico (EPA-C20:5) en tales membranas reflejarían la ingesta estimada de poliinsaturados omega 6 y omega 3 (de origen marino), respectivamente.

3. Del estudio del estado de metilación del ADN en sangre periférica de voluntarias sanas y de pacientes de cáncer de mama, así como en glándula mamaria y tejido tumoral de pacientes:

3.1. En el estudio de la metilación global del ADN:

3.1.1. La metilación global en sangre periférica es superior en enfermas en relación a las sanas, pudiendo ser debido, al menos en parte, al efecto del proceso carcinogénico sobre la alteración de las subpoblaciones de leucocitos circulantes.

3.1.2. En las pacientes, el tejido tumoral presenta un menor grado de metilación de secuencias LINE-1 que la glándula mamaria, evidenciando la relevancia de la hipometilación global del ADN durante el proceso neoplásico mamario.

3.2. En el estudio de la metilación gen-específica:

3.2.1. La frecuencia y el grado de metilación del ADN depende tanto del gen como del tejido en estudio.

3.2.2. Las frecuencias de metilación del panel de los 12 genes estudiados son siempre superiores en tejido tumoral, y de forma significativa en el caso de los genes RAR β 2, PRB, RASSF1A, NES1, TWIST1, CDH1, HLA-A y ESR1. La hipermetilación de dichos genes evidenciaría la disrupción del epigenoma durante el proceso neoplásico mamario.

3.2.3. Los genes BRCA1, ESR1 y RASSF1A serían candidatos a biomarcadores de riesgo de cáncer de mama humano, basándose en la frecuencia (BRCA1 y RASSF1A) y en el grado de metilación (BRCA1 y ESR1) de sus regiones promotoras en sangre periférica.

3.3. Del análisis de la influencia de los parámetros clínicos y de estilo de vida sobre la metilación del ADN:

- 3.3.1.** El grado de metilación de los genes BRCA1 y ESR1 correlaciona positivamente con parámetros asociados a la reproducción y considerados factores de riesgo de cáncer de mama, tales como la edad en la primera gestación y la edad de aparición de la menopausia. Esto sugeriría que dichos factores podrían estar modulando el riesgo frente a este tipo de neoplasia, en parte, a través de la alteración de los patrones epigenéticos.
- 3.3.2.** Una elevada ingesta de calorías, proteínas, lípidos totales, ácidos grasos saturados, donadores de grupos metilo y alcohol podría incrementar la metilación gen-específica en los distintos tejidos, especialmente de BRCA1 y ESR1, mientras que la realización de actividad física podría disminuir la metilación génica en glándula mamaria.

B. ESTUDIO EN EL MODELO EXPERIMENTAL

- 1. Del estudio de la influencia de las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz (rica en PUFA n-6) y de aceite de oliva virgen extra (rica en MUFA n-9 y componentes bioactivos) sobre la expresión de los genes supresores tumorales RASSF1A, TIMP3 y CDKN2c en glándula mamaria y tejido tumoral:**
- 1.1.** En glándula mamaria la expresión de dichos genes muestra variaciones durante la fase de pubertad, probablemente relacionado con la proliferación y diferenciación asociadas a su desarrollo. Asimismo, la expresión de estos genes disminuye en la etapa adulta, posiblemente como consecuencia, entre otros factores, del propio proceso del envejecimiento.
- 1.2.** En glándula mamaria y tumor la expresión génica de RASSF1A y TIMP3 está disminuida en los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de oliva. Por otro lado, la dieta hiperlipídica de aceite de maíz también disminuye la expresión de TIMP3 en ambos tejidos.
- 1.3.** El tejido tumoral presenta una menor expresión génica de RASSF1A y TIMP3 en relación a la glándula mamaria. Por su parte, la pérdida de expresión del gen supresor tumoral CDKN2c en este modelo experimental no jugaría un papel tan destacado en el proceso carcinogénico mamario.

2. De la determinación del efecto modulador de estos lípidos sobre la metilación del ADN en tejido mamario:

2.1. En el estudio de la metilación global del ADN:

2.1.1. En glándula mamaria el grado de metilación genómica disminuye en la adolescencia, pudiendo ser un reflejo de la elevada tasa de proliferación de dicho tejido que favorecería la desmetilación pasiva del ADN. En edad adulta también decrece la metilación global del ADN, posiblemente debido al incremento de la desmetilación activa por efecto de la edad.

2.1.2. Los grupos alimentados con dieta hiperlipídica de aceite de oliva presentan los mayores niveles de metilación global en glándula mamaria en la pubertad, período de máxima susceptibilidad a la transformación neoplásica, hecho que sugeriría que dicha dieta disminuye el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia.

2.1.3. En adenocarcinomas mamarios la dieta rica en aceite de oliva incrementa el grado de metilación genómica.

2.1.4. Los niveles de metilación global no disminuyen en tumor respecto a glándula mamaria, quizás debido a que la glándula mamaria está inducida químicamente con DMBA.

2.2. En el estudio de la metilación gen-específica:

2.2.1. En tejido tumoral el grado de metilación génica de RASSF1A y TIMP3 es mayor que en glándula mamaria, sugiriendo que la hipermetilación de dichos genes supresores tumorales juega un papel relevante en la carcinogénesis mamaria experimental.

2.2.2. La dieta rica en aceite de maíz aumenta el grado de metilación génica de RASSF1A y TIMP3 tanto en glándula mamaria como en tejido tumoral, mientras que la dieta rica en aceite de oliva únicamente incrementa el grado de metilación de RASSF1A en tumor, adquiriendo valores similares a los del grupo control.

2.3. De la caracterización de las enzimas ADN metiltransferasas:

2.3.1. Las tres isoformas de ADN metiltransferasa (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) presentan una expresión génica coordinada en ambos tejidos mamarios, hallándose una mayor expresión de DNMT1 en comparación con las ADN metiltransferasas *de novo* (DNMT3a y DNMT3b).

2.3.2. El tejido tumoral presenta mayor actividad enzimática ADN metiltransferasa total que la glándula mamaria, pese a mostrar menor expresión génica de las isoformas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b.

2.3.3. La dieta hiperlipídica de aceite de maíz incrementa la actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria y tejido tumoral. Además, en los grupos alimentados con dicha dieta esta actividad enzimática correlaciona con el grado de metilación gen-específica de RASSF1A y TIMP3. Por su parte, la dieta rica en aceite de oliva únicamente incrementa la actividad ADN metiltransferasa en glándula mamaria.

3. Del análisis de la influencia de estas dietas hiperlipídicas sobre modificaciones postraduccionales de las histonas:

3.1. El tejido tumoral muestra menores niveles globales de las cuatro modificaciones de histonas evaluadas en comparación con la glándula mamaria, especialmente de H3K27me3, H4K20me3 y H4K16ac, sugiriendo que la pérdida de estas modificaciones de histonas jugaría un papel relevante en la carcinogénesis mamaria experimental.

3.2. Las dietas hiperlipídicas alteran las modificaciones postraduccionales de las histonas. Así, la dieta rica en aceite de maíz disminuye los niveles de H3K27me3 en glándula mamaria, mientras que la rica en aceite de oliva reduce los de H4K16ac en glándula mamaria y los de H4K20me3 en tumor.

Del balance integrado de los resultados obtenidos en el estudio en humanos y en el modelo experimental:

La influencia que ejerce la propia enfermedad sobre el epigenoma altera mecanismos epigenéticos comunes entre el cáncer de mama humano y el experimental. Dichas alteraciones estarían caracterizadas por el incremento de la metilación gen-específica asociado a un aumento de la actividad ADN metiltransferasa, la disminución de la expresión de genes supresores tumorales y la alteración de modificaciones postraduccionales de histonas.

Factores dietéticos y de estilo de vida, especialmente los relacionados con el consumo de lípidos (tanto en cantidad total como en función del tipo) podrían estar incidiendo en el riesgo de cáncer de mama mediante la modificación de los patrones epigenéticos.

..... **BIBLIOGRAFÍA** ■

NOTA:

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

- [113] ESCRICH E, PRATS M, FERRER M, CASAMITJANA R, GAYA JM and RIVERA F. Determinación de receptores estrogénicos en patología mamaria humana: aspectos técnicos y su significado clínico. *Pharmatherapeutica* 1980, 2:S102-S107.
- [439] HUGGINS C, GRAND LC, BRILLANTES FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature* 1961, 189:204-207.
- [443] HUGGINS C, MORII S, GRAND LC. Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann. Surg.* 1961, 154:315-318.
- [453] ROSEN JM, RICHARDS DA, GUYETTE W and MATUSIK RJ. Steroid-hormone modulation of prolactin action in the rat mammary gland. En "Gene Regulation by Steroid Hormones", ROY AK and CLARK JH, Springer-Verlag, New York Inc., 1980, 58-77.
- [583] DELOUIS C. Histopathologie du sein: rôle des hormones dans l'élaboration de la maturation du tissu mammaire. Em "Récepteurs hormonaux et pathologie mammaire", PM MARTIN, Medsi, Paris, 1980, 11-12.
- [586] NETTER FH. Anatomía y patología de la glándula mamaria. En "Sistema reproductor", tomo II, Colección Ciba de ilustraciones médicas, Salvat, 1982, 243-63.
- [603] McMAHON B, COLE P and BROWN J. Etiology of human breast cancer: a review. *J Nat Cancer Inst.* 1973, 50:21-42.
- [798] ESCRICH E. Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamarios experimentales. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA, 1985.
- [824] DESLYPERE JP, VERDONCK MA, VERMEULEN A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1985, 61:564-570.
- [860] ARMSTRONG BK, McMICHAEL AJ and MacLENNAN R. Diet. En "Cancer epidemiology and prevention". SCHOTTENFELD D and FRAUMENI Jr JF. WB Saunders Company, Philadelphia, 1982, 419-32.
- [861] PETRAKIS NL, ERNSTER VL, KING MC. Breast. En "Cancer Epidemiology and Prevention", D SCHOTTENFELD, JF FRAUMENI Jr, WB Saunders Company, Philadelphia, 1982, 855-870.
- [868] CARROLL KK and KHOR HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 1975, 10:308-53.
- [895] KIMATA K, SAKAKURA T, INAGUMA Y, KATO M and NISHIZUKA. Participation of two different mesenchymes in the developing mouse mammary gland: synthesis of basement membrane components by fat pad precursor cells. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1985, 89:243-57.
- [918] WELSCH CW and AYLSWORTH CF. Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding high levels of dietary fat: a hormonal mechanism?. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1983, 70:215-21.
- [920] KRITCHEVSKI D, WEBER MM and KLURFELD DM. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1984, 44:3174-77.
- [921] HILLYARD LA and ABRAHAM S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. *Cancer Res.*, 1979, 39:4430-37.
- [927] AYLSWORTH CF, JONE C, TROSKO JE, MEITES J and WELSCH CW. Promotion of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary tumorigenesis by high dietary fat in the rat: possible role of intercellular communication. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 72:637-45.
- [934] SYLVESTER PW, RUSELL M, IP M and IP C. Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation, and endocrine function in rats. *Cancer Res.*, 1986, 46:757-62.
- [943] KING MM, McCAY PB and RUSSO IH. Dietary fat may influence DMBA-initiated mammary gland carcinogenesis by modification of mammary gland development. En "Diet, Nutrition, and Cancer: From Basic Research to Policy Implications", ALAN R LISS Inc, New York, 1983, 61-90.
- [976] MARTIN ME, VRANCKX R, BENASSAYAG C and NUNEZ EA. Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261:2954-59.
- [995] RUSSO J, SABY J, ISENBERG WM, RUSSO IH. Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7,12- dimethylbenz(α)anthracene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977, 59:435-445.
- [1030] HOUDEBINE LM. Contrôle hormonal du développement et de l'activité de la glande mammaire. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1986, 26:523-41.
- [1046] IP C and IP MM. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12- dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 66:291-95.
- [1047] CAVE WT Jr and JURKOWSKI JJ. Dietary lipid effects on the growth membrane composition, and prolactin-binding capacity of rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, 73:185-91.

- [1077] COHEN LA. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. *Cancer Res.*, 1981, 41:3808-10.
- [1107] COHEN LA, THOMPSON DO, CHOI K, KARMALI RA and ROSE DP. Dietary fat and mammary cancer: II- Modulation of serum and tumor lipid composition and tumor prostaglandins by different dietary fats: association with tumor incidence patterns. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 77:43-51.
- [1141] YOUNG S and HALLOWES RC. Tumours of the mammary gland. En "Pathology of Tumour in Laboratory Animals", Vol. I, Tumours of the rat. Part 1, 1973. TUROSOV, Lyon IARC, 31-74.
- [1299] ESCRICH E. Mammary cancer model induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: a good experimental tool for the study of tumour markers. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2(2):109-19.
- [1310] ADER R and FRIEDMAN SB. Plasma corticosterone response to environmental stimulation: effects of duration of stimulation and the 24-hour adrenocortical rhythm. *Neuroendocrinol.*, 1968, 3:378-86.
- [1347] GIDWITZ S, PESSIN JE, WEBER MJ, GLASER M and STORM DR. Effect of membrane phospholipid composition changes on adenylate cyclase activity in normal and rous-sarcoma-transformed chicken embryo fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 628:263-76.
- [1355] WELSCH CW. Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 45:S192-S202.
- [1358] IP C. Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 45:S218-S24.
- [1383] SOLOMONSON LP, LIEPKALNS VA and SPECTOR AA. Changes in (Na+K+)-ATPase activity of Ehrlich Ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry*, 1976, 15:892-97.
- [1438] ESCRICH E. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 1987, 2:197-206.
- [1486] IP C, IP M and SYLVESTER PW. Relevance of trans fatty acids and fish oil in animal tumorigenesis studies. En "Dietary Fat and Cancer", ALAN R LISS Inc, New York, 1986, 283-94.
- [1489] AYLSWORTH CF, WELSCH CW, KABARA JJ and TROSKO JE. Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat. *Lipids*, 1987, 22:445-54.
- [1518] SPECTOR AA and BURNS CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res.*, 1987, 47:4529-37.
- [1520] RUSSO J and RUSSO IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 1987, 57:112-37.
- [1524] RUSSO J, TAY LK, CIOCCA DR and RUSSO IH. Molecular and cellular basis of the mammary gland susceptibility to carcinogenesis. *Environ Health Perspect.*, 49:185-99.
- [1560] LOMEIO F, KHOKHER MA and DANDONA P. Unsaturated fatty acids potentiate insulin action on adipocytes. *Prog. Lipid Res.*, 1986, 25:511-13.
- [1576] GELMANN P and LIPPMAN ME. Understanding the role of oncogenes in human breast cancer. En "Growth factors and oncogenes in breast cancer". SLUYSER M, Weinheim-New York, Ellis Horwood series in biomedicine, 1987, 29-43.
- [1659] SCHOTTENFELD D and FRAUMENI JF. *Cancer Epidemiology and Prevention*, W B Saunders Company, Philadelphia, 1982.
- [1660] ARMSTRONG B and DOLL R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer*, 1975, 15:617-31.
- [1663] TANNENBAUM A. The genesis and growth of tumors. III Effects of a high fat diet. *Cancer Res.* 1942, 2:468-475.
- [1666] HILL MJ, GODDARD P and WILLIAMS REO. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet*, 1971, 2:472-73.
- [1678] ESCRICH E. Lípidos de la dieta y cáncer de mama. Tesis doctoral, Barcelona, 1990.
- [1700] ROGERS AE and LONGNECKER MP. Biology of disease. Dietary and nutritional influences on cancer: a review of epidemiologic and environmental data. *Lab. Invest.* 1988, 59:729-759.
- [1718] RUSSO IH, KOSZALKA M and RUSSO J. Human chorionic gonadotropin and rat mammary cancer prevention. *J. Natl. Cancer I.*, 1990, 82: 1286-1289.
- [1829] ESCRICH E and SEGURA R. Factores de la dieta y cáncer de mama. *Rev. Senología y Patol. Mam.* 1991, 4:86-96.
- [1854] FERNANDES G and VENKATRAMAN JT. Modulation of breast cancer growth in nude mice by omega 3 lipids. *World Rev. Nutr. Diet.* 1991, 66:488-503.
- [1870] SUNDERLAND MC and McGUIRE WL. Hormones and breast cancer. *Trends Endocrin. Met.* 1991, 2:72-76.

- [1881] CANTLEY LC, AUGER KR, CARPENTER C, DUCKWORTH B, GRAZIANI A, KAPPELLER R and SOLTOFF S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 1991, 64(2):281-302.
- [1942] BIRT DF, KRIS ES, CHOE M, PELLING JC. Dietary energy and fat effects on tumor promotion. *Cancer Res.* 1992, 52:2035s-2039s.
- [1948] VAN DE VIJVER MJ and NUSSE R. The molecular biology of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1072:33-50.
- [1959] CAVE WT. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J.* 1991, 5:2160-2166.
- [1962] FREEDMAN LS, CLIFFORD C and MESSINA M. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. *Cancer Res.*, 1990, 50:5710-19.
- [1973] BOTWELL RK. Opportunities for nutritional scientists in cancer prevention. En "Mutagens and carcinogens in the diet". Wiley-Liss, Inc., 1990, 269-284.
- [1975] HUNTER T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 1991, 64:249-70.
- [2045] CARROLL KK. Dietary fat and breast cancer. *Lipids*, 1992, 27:793-97.
- [2050] WEBER PC. n-3 fatty acids and human disease. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1990, 50:14-19.
- [2054] CHOE MI, KRIS ES, LUTHRA R, COPENHAVER J, PELLING JC, DONNELLY TE and BIRT DF. Protein kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from Sencar mice fed high fat diets. *J Nutr.* 1992, 122:2322-2329.
- [2085] DEVRIES CEE and VANNOORDEN CJF. Effects of dietary fatty acid composition on tumor growth and metastasis. *Anticancer Res.*, 1992, 12:1513-22.
- [2137] SUMIDA C, GRABER R and NUNEZ E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 1993, 48:117-22.
- [2226] HSIEH C, GOLDMAN M, PAVIA M, EKBOM A, PETRIDOU E, ADAMI H, TRICHOPOULOUS D. Breast cancer risk in mothers of multiple births. *Int. J. Cancer* 1993, 54:81-84.
- [2227] HIMENO Y, ENGELMAN RW and GOOD RA. Influence of calorie restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:5497-01.
- [2245] NAKAYAMA M, RAN JU H, SUGANO M, HIROSE N, UEKI T, DOI F and EYNARD AR. Effect of dietary fat and cholesterol on dimethylbenz(α)-anthracene-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Anticancer Res.*, 1993, 13:691-698.
- [2260] HAEFFNER EW. Diacylglycerol: formation and function in phospholipid-mediated signal transduction. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, 105C:337-345.
- [2264] CLANDININ MT, CHEEMA S, FIELD CJ, GARG ML, VENKATRAMAN J and CLANDININ TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.*, 1991, 5:2761-68.
- [2265] MIZUKAMI Y, NONOMURA A, NOGUCHI M, TANIYA T, THOMAS MA, NAKAMURA S and MIYAZAKI I. Effects of high and low dietary fat and indomethacin on tumour growth, hormone receptor status and growth factor expression in DMBA-induced rat breast cancer. *Int. J. Tissue React.*, 1992, 14:269-76.
- [2272] TILLOTSON JK, DARZYNKIEWICZ Z, COHEN LA and RONAI Z. Effects of linoleic acid on mammary tumor cell proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int. J. Oncol.*, 1993, 3:81-87.
- [2276] MERRILL AH and SCHROEDER JJ. Lipid modulation of cell function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1993, 13:539-59.
- [2289] ROSE DP, HATALA MA, CONNOLLY JM and RAYBURN J. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res.*, 1993, 53:4686-90.
- [2349] SCHUCHARD M, LANDERS JP, PUNKAY SANDHU N, SPELSBERG TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr. Rev.* 1993, 14:659-669.
- [2363] HOWELL A, De FRIEND D and ANDERSON E. Mecanismos de respuesta y resistencia a la terapia endocrina en el cáncer de mama y desarrollo de nuevos tratamientos. En "Revisiónes: Cáncer Endocrino-Dependiente", VHT JAMES, The Journal of Endocrinology Ltd., 1993, 43:7-26.
- [2393] RUSSO J, CALAF G, SOHI N, TAHIN Q, ZHANG PL, ALVARADO ME, ESTRADA S and RUSSO IH. Critical steps in breast carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1993, 698:1-20.
- [2406] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hCG and inhibin in breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 1994, 4:297-306.
- [2415] CLARKE SD and JUMP DB. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 1993, 32:139-149.
- [2422] CLARKE SD. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.*, 1994, 14:83-98.

- [2430] GRABER R, SUMIDA CH and NUNEZ EA. Fatty acids and cell signal transduction. *J. Lipid Med. Cell Sign.*, 1994, 9:91-116.
- [2439] GONOS ES and SPANDIDOS DA. Oncogenes in cellular immortalisation and differentiation. *Anticancer Res.* 1993, 13:1117-1122.
- [2444] BIÈCHE I, CHAMPÈME MH, LIDEREAU R. A tumor suppressor gene on chromosome 1p32-pter controls the amplification of MYC family genes in breast cancer. *Cancer Res.*, 1994, 54(16):4274-76.
- [2493] HARTWELL L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 1992, 71:543-46.
- [2501] MUELLER H, LOOP P, LIU R, WOSIKOWSKI K, KUENG W and EPPENBERGER U. Differential signal transduction of epidermal-growth-factor receptors in hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 1994, 221:631-637.
- [2522] MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNET LM and DING W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, 266:66-71.
- [2542] CLARKE SD and ABRAHAM S. Gene expression: nutrient control of pre- and post-transcriptional events. *FASEB J.*, 1992, 6:3146-52.
- [2545] BLAKE WL and CLARKE SD. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J. Nutr.*, 1990, 12:1727-29.
- [2547] JUMP DB, CLARKE SD, MacDOUGALD O and THELEN A. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:8454-58.
- [2549] KIM KH and TAE HJ. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.*, 1994, 124:1273S-83S.
- [2556] DIVECHA N and IRVINE RF. Phospholipid signaling. *Cell*, 1995, 80:269-78.
- [2567] ESCRICH E, SOLANAS M and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I-diet definition. *Int. J. In Vivo Res.*, 1994, 8(6):1099-106.
- [2568] ESCRICH E, SOLANAS M, RUIZ DE VILLA MC, RIBALTA T, MUNTANE J and SEGURA R. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II-suitability of the diets. *Int. J. In Vivo Res.*, 1994, 8(6):1107-12.
- [2586] WOOSTER R and STRATTON MR. Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. *Trends Genet.*, 1995, 11:3-5.
- [2602] PERONA R. Regulación de la apoptosis y su papel en la terapia antitumoral. *Oncología* 1995, 18:47-52.
- [2606] SAGER R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 1989, 246(4936):1406-12.
- [2608] HUNTER DJ, WILLET WC. Diet, body build, and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.* 1994, 14:393-418.
- [2612] BURN P. Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 1988, 13:79-83.
- [2613] NIGGLI V and BURGER MM. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Membrane Biol.*, 1987, 100:97-121.
- [2614] GRIMARD R, TANCREDE P and GICQUARD C. Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 190:1017-22.
- [2617] LANDSCHULTZ KT, KAESTNER KH and LANE MD. Regulation of mouse liver stearoyl-CoA desaturase gene expression by dietary carbohydrate and fat. *FASEB J.*, 1991, 5:A1649.
- [2631] BIRKENFELD A and KASE NG. Functional anatomy and physiology of the female breast. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 1994, 21:433-44.
- [2632] KELLER-WOOD M and BLAND KI. Breast physiology in normal, lactating and diseased states. En "The Breast. Comprehensive Managements of Benign and Malignant Diseases". BLAND KI and COPELAND EM, 1991, 36-40.
- [2633] IMAGAWA W, YANG J, GUZMAN R and NANDI S. Control of mammary gland development. En "The Physiology of Reproduction", E KNOBIL, JD NEIL, Raven Press, Ltd., New York, 1994, 1033-63.
- [2636] YEN SSC. Prolactina en la reproducción humana. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 382-413.
- [2637] CATT KJ and DUFAU ML. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acciones. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 126-77.

BIBLIOGRAFÍA

- [2638] YEN SCC. Ciclo menstrual humano: regulación neuroendocrina. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 296-332.
- [2639] SANTEN RJ. Hipogonadismo humano. En "Endocrinología de la Reproducción". YEN SCC and JAFFE RB, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1993, 765-820.
- [2642] ESCRICH E, MUNTANE J, RIBALTA T, COLOM J, SOLANAS M, SEGURA R. Efectos de una dieta hiperlipídica sobre la carcinogénesis mamaria experimental: contenido y tipo de tumores. *Neoplasia* 1992, 9:54-56.
- [2643] APARICIO CANO J, CENDEJAS MM and LARRODERA LOPEZ L. Determinación de receptores de estrógenos y progesterona en 504 muestras de carcinoma mamario. *Quím. Clin.* 1995, 14:63-68.
- [2645] WEISZ A and BRESCIANI F. Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Critical Rev. Oncogenesis* 1993, 4:361-388.
- [2648] SAMBROOK J, FRITSCH EF and MANIATIS T. En "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [2789] E XTON JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.*, 1994, 56:349-69.
- [2844] FEUNTEUN J, LENOIR GM. BRCA1, a gene involved in inherited predisposition to breast and ovarian cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1242:177-180.
- [2845] GAYTHER SA, WARREN W, MAZOYER S, RUSSELL PA, HARRINGTON PA, CHIANO M, SEAL S, HAMOUDI R, VAN RENSBURG EJ, DUNNING AM, LOVE R, EVANS G, EASTON D, CLAYTON D, STRATTON MR and PONDER BA. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat. Genet.*, 1995, 11:428-33.
- [2875] HAECKER G and VAUX DL. Viral, worm and radical implications for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 1994, 19:99-100.
- [2949] IP C, BRIGGS SP, HAEGELE AD, THOMPSON HJ, STORKSON J and SCIMECA JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, 1996, 17:1045-50.
- [2952] RUSSO J and RUSSO IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1996, 39:7-20.
- [2955] SINGH J, HAMID R and REDDY BS. Dietary fat and colon cancer: modulating effect of types and amount of dietary fat on ras-p21 function during promotion and progression stages of colon cancer. *Cancer Res.*, 1997, 57:253-58.
- [2984] DAVIS CD and SNYDERWINE EG. Analysis of EGFR, TGF- α , neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis*, 1995, 16:3087-92.
- [3012] RONAI Z, TILLOTSON J and COHEN L. Effect of dietary fatty acids on gene expression in breast cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995, 375:85-95.
- [3019] MARTIN-MORENO JM, WILLETT WC, GORGOJO L, BANEGAS JR, RODRIGUEZ-ARTALEJO F and FERNANDEZ-RODRIGUEZ. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer*. 1994, 58(6):774-80.
- [3104] FURTH PA, BAR-PELED U, LI M. Apoptosis and mammary gland involution: reviewing the process. *Apoptosis* 1997, 2:19-24.
- [3105] LI M, LIU X, ROBINSON G, BAR-PELED U, WAGNER KU, YOUNG WS, HENNIGHAUSEN L, FURTH PA. Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997, 94:3425-3430.
- [3114] ROSE DP. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am. J. Nutr.*, 1997, 66:1513S-22S.
- [3122] RUSSO IH and RUSSO J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *J. Natl. Inst. Env. Health Sci.*, 1996, 9:938-67.
- [3123] REID SE, MURTHY MS, KAUFMAN M and SCANLON EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br. J. Surg.*, 1996, 83:1037-1046.
- [3127] AGNARSSON BA, JONASSON JG, BJÖRNSDOTTIR IB, BARKARDOTTIR RB, EGILSSON V, SIGURDSSON H. Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1988, 47:121-127.
- [3144] HARRIS, CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Environ Health Prospect.*, 1996, 104:435-39.
- [3165] RUSSO J and RUSSO IH. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)*, 1997, 57:S81-S91.
- [3185] CAVE WT Jr. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatm.*, 1997, 46:239-46.

- [3205] IP C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 66:S15235-S95.
- [3229] VISIOLI F and GALLI C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev.* 1998, 56:142-7.
- [3321] WREN BG. Do progestagens reduce the risk of breast cancer? A review of the evidence. *Menopause*, 1996, 3:4-12.
- [3326] IBRAHIM NK and HORTOBAGYI GN. New antiestrogens in breast cancer: a review. *Breast J.*, 1998, 4:213-29.
- [3332] GRAHAM JD and CLARKE CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.*, 1997, 18:502-19.
- [3334] ROSEN JM, HUMPHREYS R, KRNACIK S, JUO P and RAUGHT B. The regulation of mammary gland development by hormones, growth factors, and oncogenes. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1994, 387:95-111.
- [3338] FAY MP, FREEDMAN LS, CLIFFORD CK and MIDTHUNE DN. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.*, 1997, 57(18):3979-88.
- [3339] WATSON WH, CAI J and JONES DP. Diet and apoptosis. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20: 485-505.
- [3355] DAVIDSON LA, LUPTON JR, JIANG JH and CHAPKINS RS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis*, 1999, 5:785-91.
- [3370] SRIVASTAVA P, RUSSO J, MGBONYEBI OP and RUSSO IH. Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells. *Anticancer Res.*, 1998, 18:4003-10.
- [3371] SPENCER SJ, CATALDO NA, JAFFE RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1996, 51:314-323.
- [3372] BENAUD C, DICKSON RB and THOMPSON EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, 50:97-116.
- [3403] GRANDIEN K, BERKENSTAM A, GUSTAFSSON JA. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997, 29:1343-1369.
- [3405] IWASE H, OMOTO Y, IWATA H, HARA Y, ANDO Y and KOBAYASHI S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology*, 1998, 55:S11-S16.
- [3408] GULLICK WJ and SRINIVASAN R. The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 52:43-53.
- [3421] WYNDER EL, COHEN LA, MUSCAT JE, WINTERS B, DWYER JT and BLACKBURN G. Breast cancer: weighting the evidence for a promoting role of dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997, 89:766-75.
- [3503] RUSSO H, GUSTERSON BA, ROGERS AE, RUSSO IH, WELLINGS SR and ZWIETEN J. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Investing.*, 1990, 3:244-78.
- [3535] VACARESSE N, LAJOIE-MAZENC I, AUGE N, SUC I, FRISACH MF, SALVAYRE R and NEGRE-SALVAYRE A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ. Res.*, 1999, 85:892-99.
- [3557] REBBECK TR. Inherited Genetic Predisposition in Breast Cancer. A population-based perspective. *Cancer* 1999, 86:2493-2501.
- [3567] BANNI S, ANGIONI E, CASU V, MELIS MP, CARTA G, CORONGIU FP, THOMPSON H and IP C. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*, 1999, 6:1019-24.
- [3568] BARTSCH H, NAIR J and OWEN RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999, 20:2209-2218.
- [3569] ROSE DP and CONNOLLY JM. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.*, 1990, 50:7139-44
- [3573] WEISBURGER JH. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1997,97:S16-S23.
- [3581] SNYDERWINE EG and DAVIS CD. Proliferation, development and DNA adduct levels in the mammary gland of rats given 2-amino-1-methyl-phenylimidazo [4,5-b] pyridine and a high-fat diet. *Carcinogenesis*, 1998, 19:1209-15.
- [3588] HILAKIVI-CLARKE L, STOICA A, RAYGADA M and MARTIN MB. Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring. *Cancer Res.*, 1998, 58(4):654-60.
- [3615] WOUTERSEN RA, APPEL MJ, GARDEREN-HOETMER A and VW WIJNANDS M. Dietary fat and carcinogenesis. *Mut. Res.*, 1999, 443:111-27.

- [3616] HAMID R and SING J. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and 2 in NMU-induced rat mammary tumors. *Intl. J. Oncol.*, 1999, 14:523-28.
- [3619] RAO C, NEWMARK H and REDDY B. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 1998, 2:287-90.
- [3620] TJ SMITH, GY YANG, DN SERIL, J LIAO, and S KIM. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 703-06.
- [3672] SOLANAS M, MORAL R, COLOMER R and ESCRICH E. Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J. Women's Cancer*, 2000, 2:67-72.
- [3673] KRITCHEVSKY D. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Toxicol. Sciences*, 1999, 52:13-16.
- [3695] DANIEL LW, SCIORRA VA and GHOSH S. Phospholipase D, tumor promoters, proliferation and prostaglandins. *Bioch. Biophys. Acta*, 1999, 1439:265-76.
- [3701] UCHIDA N, OKAMURA S-I, NAGAMAGHI Y and YAMASHITA S. Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997, 123:280-85.
- [3771] NEWMARK HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999, 889:193-203.
- [3824] GLASGOW WC, HUI R, EVERHART AL, JAYAWICKREME SP, ANGERMAN-STEWART J, HAN BB and ELING TE. The linoleic acid metabolite, (13S)-hydroperoxyoctadecadienoic acid, augments the epidermal growth factor receptor signalling pathway by attenuation of receptor dephosphorylation. Differential response in Syrian hamster embryo tumor suppressor phenotypes. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272:19269-19276.
- [3840] LEE MM and LIN SS. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:221-48.
- [3844] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.*, 2000, 83:S59-S66.
- [3857] KACHHAP SK, DANGE P and NATH GHOSH S. Effect of ω -6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Let.*, 2000, 154:115-20.
- [3864] MARTIN-MORENO JM. The role of olive oil in lowering cancer risk: Is this real gold or simply pinchbeck? *J. Epidemiol. Commun. Health* 2000, 54:726-727.
- [3874] McPHERSON K, STEEL CM, DIXON JM. Breast cancer - epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* 2000, 321:624-628.
- [3908] AREA DE EPIDEMIOLOGÍA AMBIENTAL Y CÁNCER. Mortalidad por cáncer en España, 1998. Centro Nacional de Epidemiología. <http://193.146.50.130/cancer/mort98.txt>.
- [3923] WEISS L and GREEP RD. La glándula mamaria. En "Histología". Ed. "El Ateneo", Barcelona, 1982, 4ª ed., 822-45.
- [3924] ROSEN PP and OBERMAN HA. Anatomy. En "Tumors of the mammary gland". ROSAI J and SOBIN LH, AFIP, Washington DC, 1992, 11-13.
- [3929] CLARKE SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 2001, 131:1129-32.
- [3947] ESCRICH E, SOLANAS M, SOLER M, RUIZ DE VILLA MC, SÁNCHEZ JA and SEGURA R. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.*, 2001, 12:536-49.
- [3950] ESCRICH E. Endocrine aspects of breast cancer. En "Senology", Cardoso J Ed. Monduzzi Editore. Págs. 599-603. Bologna (Italy), 1998.
- [3957] SCHORR K, LI M, KRAJEWSKI S, REED JC, FURTH PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1999, 4:153-164.
- [3965] RUSSO J, AO X, GRILL C, RUSSO IH. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat.* 1999, 53:217-227.
- [3966] RUSSO IH and RUSSO J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, 3:49-61.
- [3973] HANAHAN D and WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100:57-70.
- [3980] BÉGIN ME, ELLS G and HORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, 80:188-94.
- [3982] KENNY FS, GEE JM, NICHOLSON RI, ELLIS IO, MORRIS TM, WATSON SA, BRYCE RP and ROBERTSON JF. Effect of dietary GLA+/-tamoxifen on the growth, ER expression and fatty acid profile of ER positive human breast cancer xenografts. *Int J. Cancer*, 2001, 92:342-47.

- [3983] JIANG WG, HISCOX S, HORROBIN DF, BRYCE RP and MANSEL RE. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 237:639-44.
- [4061] EVAN GI and VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, 411:342-48.
- [4093] KUMAR R, VADLAMUDI RK and ADAM L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-rel. Cancer* 2000, 7:257-269.
- [4155] HWANG D. Fatty acids and immune responses - A new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20:431-56.
- [4198] PRIOR IA and HANCOCK JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J. Cell Sci.*, 2001, 114: 1603-08.
- [4202] SOLANAS M, MORAL R and ESCRICH E. Mecanismos de activación de proto-oncogenes. Papel de la sobreexpresión génica en cáncer de mama. *Oncología*, 2002, 25:243-57.
- [4216] SIMONS K and IKONEN E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387:569-72.
- [4264] COSTA I, SOLANAS M and ESCRICH E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12-dimethylbenz(α)anthracene in the rat. A comparative analysis with human breast tumours. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2002, 126(8): 915-27.
- [4300] STARK AH and MADAR Z. Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutr. Reviews*, 2002, 60(6): 170-76.
- [4303] SOLANAS M, HURTADO A, COSTA I, MORAL R, MENENDEZ JA, COLOMER R and ESCRICH E. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int. J. Oncol.*, 2002, 21(4):745-53.
- [4324] STOLL BA. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *British J. Nut.*, 2002, 87:193-98.
- [4325] BERNARD-GALLON DJ, VISSAC-SABATIER C, ANTOINE-VINCENT D, RIO PG, MAURIZIS JC, FSTIER P and BIGNON YJ. Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *Br. J. Nut.*, 2002, 87: 281-89.
- [4349] WILLET WC. Diet and cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidem., Biomarkers Prev.*, 2001, 10:3-8.
- [4350] WILLET WC. Diet and breast cancer. *J. Internal Med.*, 2001, 249:395-411.
- [4353] TAVANI A, PELUCCHI C, PARPINEL M, NEGRI E, FRANCESCHI S, LEVI F and LA VECCHIA C. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. *Int. J. Cancer*, 2003, 105:113-16.
- [4399] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer*, 2000, 36(10):1235-47.
- [4401] JIANG WG, HISCOX S, HALLET MB, HORROBIN DF, MANSEL RE and PUNTIS MC. Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res.*, 1995, 55:5043-48.
- [4473] SANT M, ALLEMANI C, BERRINO F, COLEMAN MP, AARELEID T, CHAPLAIN G, COEBERGH JW, COLONNA M, CROSIGNANI P, DANZON A, FEDERICO M, GAFÀ L, GROSCLAUDE P, HÉDELIN G, MACÈ-LESECH J, MARTÍNEZ C, MÖLLER J, PACI E, RAVERDY N, TRETARRE B and WILLIAMS EMI. Breast carcinoma survival in Europe and the United States. A population-based study. *Cancer* 2004, 100:715-722.
- [4505] POWER KA and THOMPSON LU. Ligand-induced regulation of ER α and ER β is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003, 81:209-21.
- [4506] MAGEE PJ and ROWLAND IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British J. Nut.*, 2004, 91:513-31.
- [4534] NATHANSON KN, WOOSTER R and WEBER BL. Breast Cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Med.*, 2001, 7(5):552-56.
- [4538] IP MM, MASSO-WELCH PA and IP C. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: Role of the stroma and the epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2003, 8:103-18.
- [4539] ROCK CL. Diet and breast cancer: Can dietary factors influence survival? *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.*, 2003, 8(1):119-32.
- [4540] KAPUT J and RODRÍGUEZ RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol. Genomics*, 2004, 16:166-77.
- [4541] JUMP DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences*, 2004, 41(1):41-78.
- [4542] REYES N, REYES I, TIWARI R and GELIEBTER J. Effect on linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett.*, 2004, 209:25-35.

- [4543] KHAN SA and HEUVEL JPV. Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids. *J. Nut. Biochem.*, 2003, 14:554-67.
- [4546] LARSSON S, KUMLIN M, INGELMAN-SUNDBERG M and WOLK A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79:935-45.
- [4547] STULNIG TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2003, 132:310-21.
- [4577] ANDERSON E and CLARKE RB. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J. Mamm. Gland Neopl.*, 2004, 9:3-13.
- [4595] KEEN JC and DAVIDSON NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 2003, 97:825-33.
- [4614] MA DWL, SEO J, DAVIDSON LA, CALLAWAY ES, FAN YY, LUPTON JR and CHAPKIN RS. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J.*, 2004, 18:1040-42.
- [4615] BROWN DA and LONDON E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:17221-17224.
- [4623] NAROD SA and FOULKES WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews*, 2004, 4:665-76.
- [4631] OCHOA-HERRERA JJ, HUERTAS JR, QUILES JL and MATAIX J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J. Nut. Biochem.*, 2001, 12:357-64.
- [4647] BRAY F, McCARRON P and PARKIN DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.*, 2004, 6:229-39.
- [4651] MILLER WR and SHARPE RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancer. *Endocrine-Rel. Cancer* 1998, 5:69-96.
- [4653] HARVEY PW and DARBRE P. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *J. Appl. Toxicol.*, 2004, 24:167-76.
- [4662] ADLERCREUTZ H. Phytoestrogens and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 83:113-18.
- [4680] CAVALIERI E, FRENKEL K, LIEHR JG, ROGAN E and ROY D. Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 2000, 27:75-93.
- [4713] MITRA AK, FARUQUE FS and AVIS AL. Breast cancer and environmental risks: Where is the link? *J. Environm. Health*, 2004, 66:24-32.
- [4716] WATSON CS, GAMETCHU B, NORFLEET AM, CAMPBELL CH and THOMAS ML. Rapid, nongenomic actions of estrogens. *Women Cancer* 1998, 1:21-28.
- [4718] WATSON CS, CAMPBELL CH and GAMETCHU B. The dynamic and elusive membrane estrogen receptor. *Steroids* 2002, 67:429-437.
- [4719] BULAYEVA NN and WATSON CS. Xenostrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signalling pathways. *Environm. Health Perspect.* 2004, 112:1481-1487.
- [4722] PARKER BS, ARGANI P, COOK BP, LIANGFENG H, CHARTRAND SD, ZHANG M, SAHA S, BARDELLI A, JIANG Y, MARTIN TBS, NACHT M, TEICHER BA, KLINGER KW, SUKUMAR S and MADDEN SL. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.*, 2004, 64:7857-66.
- [4723] GUO W and GIANCOTTI FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, 5(10):816-26.
- [4735] ESCRICH E, MORAL R, GARCÍA G, COSTA I, SÁNCHEZ JA and SOLANAS M. Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol. Carcinogen.*, 2004, 40:73-78.
- [4736] COSTA I, MORAL R, SOLANAS M and ESCRICH E. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 86(3):225-35.
- [4743] OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, WÜRTELE G, SPIEGELHALDER B and BARTSCH H. Olive-Oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet*, 2000, 1:107-12.
- [4744] MA DWL, SEO J, SWITZER KC, FAN YY, McMURRAY DN, LUPTON JR, CHAPKIN RS. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.* 2004, 15:700-706.
- [4765] MORENO JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.*, 2003, 35:1073-81.

- [4804] DOWHAN W, MILEYKOVSKAYA E and BOGDANOV M. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1666:19-39.
- [4811] SOLANAS M, ESCRICH E, ROUZAUT A, COSTA I, MARTÍNEZ A and NOTARIO V. Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[α]anthracene. *Mol. Carcinog.*, 2002, 33:219-27.
- [4816] TOMASSONI ML, AMORI D and MAGNI MV. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 258:476-81.
- [4818] HULBERT AJ, TURNER N, STORLIEN LH and ELSE PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 2005, 80: 155-69.
- [4822] HULBERG AJ and ELSE PL. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Ann. Rev. Physiol.*, 2000, 62: 207-35.
- [4824] HOLDER JW, ELMORE E and BARRET JC. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.*, 1993, 53:3475-85.
- [4837] KOSOY G, MADAR Z, BEN-HUR H, GAL R, STARK A, COHEN O and ZUSMAN I. Transplacental effect of a 15% olive-oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tumors of rat offspring. *Oncol. Rep.*, 2001, 8:1045-49.
- [4865] HU X, JUNEJA SC, MAIHLE NJ and CLEARY MP. Leptin –a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 94:1704-11.
- [4895] REYES N, IATROPOULOS M, MITTELMAN A and GELIEBTER J. Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2002, 11Suppl 2:S37-S42.
- [4914] FREEMAN MR and SOLOMON KR. Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 2004, 91:54-69.
- [4972] MILES EA, ZOUBOULI P and CALDER PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 2005, 21:389-94.
- [4992] CALDER PC, YAQOOB P, THIES F, WALLACE FA and MILES EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.*, 2002, 87:S31-S48.
- [4994] YAQOOB P, KNAPPER JA, WEBB DH, WILLIAMS CM, NEWSHOLME EA and CALDER PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67:129-35.
- [5041] HUGHES-FULFORD M, CHEN Y and TJANDRAWINATA RR. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 2001, 22:701-05.
- [5149] MENENDEZ JA, VELLON L, COLOMER R and LUPU R. Effect of δ -linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, 97:1611-15.
- [5321] ESCRICH E, SOLANAS M and MORAL R. Olive oil, and other dietary lipids, in 575 cancer: experimental approaches. En “Olive Oil and Health”, QUILES JL, RAMIREZ-TORTOSA MC, YAQOOB P, CAB International, Oxfordshire, UK, 2006, pp. 317-74.
- [5367] KEY TJ, APPLEBY PN, REEVES GK *et al.* (49 authors). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95:1218-1226.
- [5368] LAHMANN PH, HOFFMANN K, ALLEN N *et al.* (41 authors). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer* 2004, 111:762-771.
- [5423] FRISCH RE, HEGSTED DM and YOSHINAGA K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, 72:4172-76.
- [5447] RAZANI B, WOODMAN SE and LISANTI MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54:431-67.
- [5449] RAJENDRAN L and SIMONS K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.*, 2005, 118:1099-102.
- [5451] SIMONS K and VAZ WLC. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004, 33:269-95.
- [5465] MINEO C, JAMES GL, SMART EJ and ANDERSON RGW. Localization of Epidermal Growth Factor-stimulated Ras/Ras-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:11930-35.
- [5481] ZHUANG L, LIN J, LU ML, SOLOMON KR, FREEMAN MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate Akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002, 62:2227-2231.
- [5484] WALKER SA and LOCKYER PJ. Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci.*, 2004, 117:2879-86.
- [5576] GREEN DR and EVAN GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 2002, 1:19-30.
- [5612] SCHLEY PD, BRINDLEY DN and FIELD CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J. Nutr.*, 2007, 137:548-53.

- [5655] BENAKANAKERE I, BESCH-WILLIFORD C, SCHNELL J, BRANDT S, ELLERSIECK MR, MOLINOLO A and HYDER SM. Natural and synthetic progestins accelerate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12:4062-4071.
- [5659] HAYASHI SI, EGUCHI H, TANIMOTO K, YOSHIDA T, OMOTO Y, INOUE A, YOSHIDA N and YAMAGUCHI Y. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2003, 10:193-202.
- [5660] CLARKE RB, ANDERSON E, HOWELL A. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2004, 15:316-323.
- [5664] NOGUCHI M, TANIYA T, KOYASAKI N, KUMAKI T, MIYAZAKI I and MIZUKAMI Y. Effects of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on tumorigenesis, tumor proliferation, cell kinetics, and receptor contents of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in Sprague-Dawley rats fed a high- or low-fat diet. *Cancer Res.*, 1991, 51(10):2683-89.
- [5672] CUI X, SCHIFF R, ARPINO G, OSBORNE CK, LEE AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23:7721-7735.
- [5673] SINGH RR and KUMAR R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005, 96:490-505.
- [5685] EDWARDS DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 2005, 67:335-376.
- [5767] KRIS-ETHERTON PM, PEARSON TA, WAN Y, HARGROVE RL, MORIARTY K, FISHELL V and ETHERTON TD. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 70:1009-15.
- [5782] MATTHEWS J and GUSTAFSSON JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.* 2003, 3:281-92.
- [5795] MANN DR and PLANT TM. Leptin and pubertal development. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2002, 20:93-102.
- [5796] AUBERT ML, PIERROZ DD, GRUAZ NM, D'ALLÈVES V, VUAGNAT BAM, PRALONG FP, BLUM WF and SIZONENKO PC. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropéptido Y and leptin. *Mol. Cel. Endocrinol.*, 1998, 140:107-13.
- [5797] CHEUNG CC, THORNTON JE, NURANI SD, CLIFTON DK and STEINER RA. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*, 2001, 74(1):12-21.
- [5812] VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M and MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 160:1-40.
- [5816] HILAKIVI-CLARKE L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2007, 7(5):465-74.
- [5817] KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HÄGGBLAD J, NILSSON S and GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997, 138:863-870.
- [5845] OLTRA AM, CARBONELL F, TORMOS C, IRADI A and SÁEZ GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, 30(11):1286-92.
- [5869] ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L and TENA-SEMPERE M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.*, 2008, 29(1):48-69.
- [5879] TODOROVA VK, HARMS SA, KAUFMANN Y, LUO S, LUO KQ, BABB K and KLIMBERG VS. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 88(3):247-56.
- [5887] RAY A, NKHATA KJ, GRANDE JP and CLEARY MP. Diet-induced obesity and mammary tumor development in relation to estrogen receptor status. *Cancer Lett.*, 2007, 253:291-300.
- [5889] JACOB J, SEBASTIAN KS, DEVASSY S, PRIYADARSINI L, FAROOK MF, SHAMEEM A, MATHEW D, SREEJA S, THAMPAN RV. Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 246:34-41.
- [5892] LEVIN ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.* 2001, 91:1860-1867.
- [5895] ZHAO C, DAHLMAN-WRIGHT K and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl. Recept. Signal* 2008, 6:e003.

- [5965] MORAL R, SOLANAS M, GARCIA G, GRAU L, VELA E, ESCRICH R and ESCRICH E. High corn oil and high extra virgin olive oil diets have different effects on the expression of differentiation-related genes in experimental mammary tumors. *Oncol. Rep.*, 2008, 20(2):429-35.
- [5975] DE WAARD F and THIJSSSEN JHH. Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2005, 97(5):451-8.
- [6009] RUSSO J and RUSSO IH. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res.*, 1980, 40:2677-87.
- [6051] Gallus S, Bosetti C and La Vecchia C. Mediterranean diet and cancer risk. *Eur J Cancer Prev.*, 2004, 13(5):447-52.
- [6063] ANBUSELVAM C, VIJAYAVEL K and BALASUBRAMANIAN MP. Protective effect of *Operculina turpethum* against 7,12-dimethyl benz(a)anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. *Chem. Biol. Interact.*, 2007, 20:168(3):229-36.
- [6074] COLLINS AR, DUSINSKÁ M, GEDIK CM and STĚTINA R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104 Suppl 3:465-69.
- [6077] KINNULA VL and CRAPO JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 36:718-44.
- [6083] PADMAVATHI R, SENTHILNATHAN P and SAKTHISEKARAN D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, 143(3):349-54.
- [6093] World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. WCRF and AICR. AICR, Washington DC. 2007. 517 pages.
- [6095] OBERLEY LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed. Pharmacother.*, 2005, 59(4):143-48.
- [6141] MURUGAN RS, MOHAN KV, UCHIDA K, HARA Y, PRATHIBA D and NAGINI S. Modulatory effects of black tea polyphenols on oxidant-antioxidant profile and expression of proliferation, apoptosis, and angiogenesis-associated proteins in the rat forestomach carcinogenesis model. *J. Gastroenterol.*, 2007, 42:352-61.
- [6143] GIULIVI C and CADENAS E. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, 1366(3):265-74.
- [6144] NOMURA K, IMAI H, KOUMURA T, ARAI M and NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:29294-302.
- [6185] ASADA K, ASADA R, YOSHIJI H, FUKUI H, FLOYD RA and KOTAKE Y. DNA cytosine methylation profile in various cancer-related genes is altered in cultured rat hepatocyte cell lines as compared with primary hepatocytes. *Oncol. Rep.*, 2006, 15(5):1241-8.
- [6196] COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M and LUNEC J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003, 17(10):1195-214.
- [6202] LIU ZJ, MAEKAWA M, HORII T and MORITA M. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ERalpha gene in tumor cell lines. *Life Sci.*, 2003, 73(15):1963-72.
- [6209] WONG IH, LO YM, ZHANG J, LIEW CT, NG MH, WONG N, LAI PB, LAU WY, HJELM NM and JOHNSON PJ. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.*, 1999, 59(1):71-3.
- [6214] MÜLLER HM, WIDSCHWENDTER A, FIEGL H, IVARSSON L, GOEBEL G, PERKMANN E, MARTH C and WIDSCHWENDTER M. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.*, 2003, 63(22):7641-5.
- [6218] BAGADI SA, PRASAD CP, KAUR J, SRIVASTAVA A, PRASHAD R, GUPTA SD and RALHAN R. Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients. *Life Sci.*, 2008, 82(25-26):1288-92.
- [6220] DAMMANN R, YANG G and PFEIFER GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res.*, 2001, 61(7):3105-9.
- [6235] FACKLER MJ, MCVEIGH M, EVRON E, GARRETT E, MEHROTRA J, POLYAK K, SUKUMAR S and ARGANI P. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2003, 107(6):970-5.
- [6237] DONNINGER H, VOS MD and CLARK GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J. Cell Sci.*, 2007, 120(18):3163-72.

- [6255] XIONG Z and LAIRD PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25(12):2532-4.
- [6257] LEHMANN U, LÄNGER F, FEIST H, GLÖCKNER S, HASEMEIER B and KREIPE H. Quantitative Assessment of Promoter Hypermethylation during Breast Cancer Development. *Am. J. Pathol.*, 2002, 160(2): 605–612.
- [6262] FRAGA MF, AGRELO R and ESTELLER M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, 1100:60-74.
- [6290] MICHEL V and BAKOVIC M. Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell*, 2007, 99:129-40.
- [6302] BOUGNOUX P, GIRAUDEAU B and COUET C. Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, 15(3):416-21.
- [6321] SCHULZ M, HOFFMANN K, WEIKERT C, NÖTHLINGS U, SCHULZE MB and BOEING H. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) - Postdam study. *Br. J. Nutr.*, 2008, 100:942-46.
- [6336] YAQOOB P. The nutritional significance of lipid rafts. *Annu. Rev. Nutr.*, 2009, 29:257-82.
- [6338] SCHMITZ G and ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 2008, 47:147-55.
- [6339] CHAPKIN RS, McMURRAY DN, DAVIDSON LA, PATIL BS, FAN YY and LUPTON JR. Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action. *Br. J. Nutr.*, 2008, 100:1152-57.
- [6430] ZMIJEWSKI JW, LANDAR A, WATANABE N, DICKINSON DA, NOGUCHI N and DARLEY-USMAR VM. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, 33:1385-89.
- [6434] CHIARUGI P and FIASCHI T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, 2007, 19:672-82.
- [6440] SUN Y, OBERLEY LW, ELWELL JH and SIERRA-RIVERA E. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. *Int. J. Cancer*, 1989, 44:1028-33.
- [6446] ESWORTHY RS, SWIDEREK KM, HO YS and CHU FF. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1381:213-26.
- [6456] OBERLEY TD and OBERLEY LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.*, 1997, 12(2):525-35.
- [6513] MASELLA R, DI BENEDETTO R, VARÌ R, FILESI C and GIOVANNINI C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 2005, 16(10):577-86.
- [6526] VISIOLI F, COLOMBO C and GALLI C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 245:487-89.
- [6575] HODSON L, SKEAFF CM and FIELDING BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid Res.*, 2008, 47(5):348-80.
- [6596] WANG Y, LAM KSL and XU A. Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res.*, 2007, 17(4):280-82.
- [6599] FERNÁNDEZ-QUINTELA A, CHURRUCA I, PORTILLO MP. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.* 2007, 10:1126-1131.
- [6609] WIDSCHWENDTER M and JONES PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 2002, 21(35):5462-82.
- [6611] SCACCINI C, NARDINI M, D'AQUINO M, GENTILI V, DI FELICE M and TOMASSI G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.*, 1992, 33:627-33.
- [6628] VICARIO IM, MALKOVA D, LUND EK and JOHNSON IT. Olive oil supplementation in healthy adults: effects in cell membrane fatty acid composition and platelet function. *Ann. Nutr. Metab.*, 1998, 42(3):160-9.
- [6658] KRATZ M, Von ECKARDSTEIN A, FOBKER M, BUYKEN A, POSNY N, SCHULTE H, ASSMANN G and WAHRBURG U. The impact of dietary fat composition on serum leptin concentrations in healthy nonobese men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87:5008-14.
- [6661] MESSINIS IE, PAPAGEORGIOU I, MILINGOS S, ASPRODINI E, KOLLIOS G and SEFERIADIS K. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Human Reprod.*, 2001, 16:1827-32.
- [6683] PAOLISSO G, RIZZO MR, MONE CM, TAGLIAMONTE MR, GAMBARDELLA A, RIONDINO M, CARELLA C, VARRICCHIO M and D'ONOFRIO F. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1998, 48:291-97.

- [6691] PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERLAY, J., TEPPA, L. and THOMAS, D.B. (eds), *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII*, IARC Scientific Publications No. 155, IARC, Lyon, 2002.
- [6692] RUIZ-GUTIÉRREZ V, PÉREZ-ESPINOSA A, VÁZQUEZ CM and SANTA-MARÍA C. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br. J. Nutr.*, 1999, 82(3):233-41.
- [6698] WOLK A, FURUHEIM M and VESSBY B. Fatty acid composition of adipose tissue and serum lipids are valid biological markers of dairy fat intake in men. *J. Nutr.*, 2001, 131(3):828-33.
- [6707] FUHRMAN BJ, BARBA M, KROGH V, MICHELI A, PALA V, LAURIA R, CHAJES V, RIBOLI E, SIERI S, BERRINO F and MUTI P. Erythrocyte membrane phospholipid composition as a biomarker of dietary fat. *Ann. Nutr. Metab.*, 2006, 50(2):95-102.
- [6712] VINOOTHINI G, MANIKANDAN P, ANANDAN R and NAGINI S. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Azadirachta indica* leaf fractions: modulation of hormone status, xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(8):1852-63.
- [6715] RAJNEESH CP, MANIMARAN A, SASIKALA KR and ADAIKAPPAN P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. *Singapore Med. J.*, 2008, 49(8):640-43.
- [6720] YUVARAJ S, PREMKUMAR VG, VIJAYASARATHY K, GANGADARAN SG and SACHDANANDAM P. Augmented antioxidant status in Tamoxifen treated postmenopausal women with breast cancer on co-administration with Coenzyme Q10, Niacin and Riboflavin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008, 61(6):933-41.
- [6728] ARIVAZHAGAN S, BALASENTHIL S and NAGINI S. Garlic and neem leaf extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzymes during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced gastric carcinogenesis in rats. *Phytother. Res.*, 2000, 14(4):291-93.
- [6753] DOMITROVIC R, TOTA M and MILIN C. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2006, 113(2):177-91.
- [6756] NAVARRO J, OBRADOR E, CARRETERO J, PETSCHEN I, AVIÑÓ J, PEREZ P and ESTRELA JM. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(3-4):410-18.
- [6759] VOEHRINGER DW, MCCONKEY DJ, MCDONNELL TJ, BRISBAY S and MEYN RE. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(6):2956-60.
- [6760] ESTRELA JM, ORTEGA A and OBRADOR E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2006, 43(2):143-81.
- [6761] OBRADOR E, NAVARRO J, MOMPO J, ASENSI M, PELLICER JA and ESTRELA JM. Regulation of tumour cell sensitivity to TNF-induced oxidative stress and cytotoxicity: role of glutathione. *Biofactors*, 1998, 8(1-2):23-6.
- [6764] YEH CC, HOU MF, WU SH, TSAI SM, LIN SK, HOU LA, MA H and TSAI LY. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem. Funct.*, 2006, 24(6):555-59.
- [6769] XUE W and WARSHAWSKY D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 206:73-93.
- [6789] XU X, GAMMON MD, ZHANG Y, BESTOR TH, ZEISEL SH, WETMUR JG, WALLENSTEIN S, BRADSHAW PT, GARBOWSKI G, TEITELBAUM SL, NEUGUT AI, SANTELLA RM and CHEN J. BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer res. Treat.*, 2009, 115(2):397-404.
- [6790] ZOU D, YOON HS, PEREZ D, WEEKS RJ, GUILFORD P and HUMAR B. Epigenetic silencing in non-neoplastic epithelia identifies E-cadherin (CDH1) as a target for chemoprevention of lobular neoplasia. *J. Pathol.*, 2009, 218(2):265-72.
- [6791] LI B, GOYAL J, DHAR S, DIMRI G, EVRON E, SUKUMAR S, WAZER DE and BAND V. CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res.*, 2001, 61(21):8014-21.
- [6801] SHUPNIK MA. Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J Neuroendocrinol.* 2002, 14:85-94.
- [6806] PENG B, LU B, LEYGUE E, MURPHY LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol.* 2003, 30:13-29.
- [6812] MOTE PA, BARTOW S, TRAN N, CLARKE CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2002, 72:163-172.
- [6813] MITCHNER NA, GARLICK C, BEN-JONATHAN N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 1998, 139:3976-3983.

- [6818] FENDRICK JL, RAAFAT AM, HASLAM SZ. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1998, 3:7-22.
- [6823] BOYAPATI SM, SHU XO, GAO YT, DAI Q, YU H, CHENG JR, JIN F and ZHENG W. Correlation of blood sex steroid hormones with body size, body fat distribution, and other known risk factors for breast cancer in postmenopausal Chinese women. *Cancer Causes Control*, 2004, 15:305-11.
- [6828] ROSNER B, COLDITZ GA and WILLETT WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1994, 139:819-35.
- [6845] CLARKE R, SKAAR T, BAUMANN K, LEONESSA F, JAMES M, LIPPMAN J, THOMPSON EW, FRETER C, BRUNNER N. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994, 31:237-48.
- [6862] WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR, 2007.
- [6864] KOCH MA. Experimental modeling and research methodology. In Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. and Franklin, C.L. (eds) "The laboratory rat". Elsevier, 2006, 587-625.
- [6879] SOLANAS M, GRAU L, MORAL R, VELA E, ESCRICH R and ESCRICH E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21ras signalling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis*, 2010, 31(5):871-79.
- [6887] MORAL R, ESCRICH R, SOLANAS M, VELA E, COSTA I, RUÍZ DE VILLA MC and ESCRICH E. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats. *Nutr. Cancer*, 2011, 63 (3):410-20.
- [6949] FUTSCHER BW, O'MEARA MM, KIM CJ, RENNELS MA, LU D, GRUMAN LM, SEFTOR RE, HENDRIX MJ and DOMANN FE. Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer. *Neoplasia*, 2004, 6(4):380-9.
- [6952] WIDSCHWENDTER M, BERGER J, HERMANN M, MULLER HM, AMBERGER A, ZESCHNIGK M, WIDSCHWENDTER A, ABENDSTEIN B, ZEIMET AG, DAXENBICHLER G and MARTH C. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92(10):826-32.
- [6966] SKIN JH, HUR JY, SEO HS, JEONG YA, LEE JK, OH MJ, KIM T, SAW HS and KIMS H. The ratio of ER α to ER β in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 2007, 72:592-99.
- [7003] BRAIT M, FORD JG, PAPAIAHGARI S, GARZA MA, LEE JI, LOYO M, MALDONADO L, BEGUM S, MCCAFFREY L, HOWERTON M, SIDRANSKY D, EMERSON MR, AHMED S, WILLIAMS CD and HOQUE MO. Association between lifestyle factors and CpG island methylation in a cancer-free population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18(11):2984-91.
- [7005] WU Y, ALVAREZ M, SLAMON DJ, KOEFFLER P and VADGAMA JV. Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC Cancer*, 2010, 10:32.
- [7021] VEECK J and ESTELLER M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2010, 15(1):5-17.
- [7022] ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358:1148-59.
- [7062] MUSGROVE EA and SUTHERLAND RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9:631-43.
- [7086] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A and BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, 454:436-44.
- [7102] ROMAGUERA D, NORAT T, VERGNAUD AC *et al.* (51 authors). Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 92:912-921.
- [7103] TRICHOPOULOU A, BAMIA C, LAGIOU P and TRICHOPOULOS D. Conformity to traditional Mediterranean diet and breast cancer risk in the Greek EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 92(3):620-5.
- [7105] HASHIM YZ, ENG M, GILL CI, McGLYNN H and ROWLAND IR. Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr. Rev.*, 2005, 63(11):374-86.
- [7107] WILLETT WC, SACKS F, TRICHOPOULOU A, DRESCHER G, FERRO-LUZZI A, HELSING E and TRICHOPOULOS D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, 61(6):1402S-1406S.
- [7108] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C and PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*, 2010, 127:2893-917.

- [7144] SOTO-GUZMÁN A, NAVARRO-TITO N, CASTRO-SANCHEZ L, MARTINEZ-OROZCO R and SALAZAR EP. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2010, 27:505-15.
- [7145] MacLENNAN M and MA DWL. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2010, 12:211.
- [7149] DAVIDSON LA, WANG N, SHAH MS, LUPTON JR, IVANOV I and CHAPKIN RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding micro RNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, 2009, 30:2077-84.
- [7151] SPENCER L, MANN C, METCALFE M, WEBB M, POLLARD C, SPENCER D, BERRY D, STEWARD W and DENNISON A. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur. J. Cancer*, 2009, 45:2077-86.
- [7152] DIMRI M, BOMMI PV, SAHASRABUDDHE AA, KHANDEKAR JD and DIMRI GP. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010,31:489-495.
- [7154] HAMMAMIEH R, CHAKRABORTY N, MILLER SA, WADDY E, BARMADA M, DAS R, PEEL SA, DAY AA and JETT M. Differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007, 101:7-16.
- [7158] DICKSON RB, THOMPSON EW, LIPPMAN ME. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990, 37:305-316.
- [7159] PÉREZ-JIMÉNEZ F, RUANO J, PÉREZ-MARTINEZ P, LOPEZ-SEGURA F and LOPEZ-MIRANDA J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Bratisl. Lek. Listy.*, 2003, 104(7-8):218-21.
- [7168] BORRELLI F and IZZO AA. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Prac. Res. Clin. Endocrinol.*, 2009, 23:33-49.
- [7178] RODRÍGUEZ DE FONSECA F, NAVARRO M, GÓMEZ R, ESCUREDO L, NAVA F, FU J, MURILLO-RODRÍGUEZ E, GIUFFRIDA A, LO VERME J, GAETANI S, KATHURLA S, GALL C, PIOMELLI D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 2001, 414:209-212.
- [7206] THABUIS C, TISSOT-FAVRE D, BEZELGUES JB, MARTIN JC, CRUZ-HERNANDEZ C, DIONISI F, DESTAILLATS F. Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. *Lipids*, 2008, 43:887-894.
- [7210] LO VERME J, GAETANI S, FU J, OVEISI F, BURTON K, PIOMELLI D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62:708-716.
- [7212] GONZÁLEZ-YANES C, SERRANO A, BERMÚDEZ-SILVA FJ, HERNÁNDEZ-DOMINGUEZ M, PÁEZ-OCHOA MA, RODRÍGUEZ DE FONSECA F, SÁNCHEZ-MARGALET V. Oleylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2005, 289:E923-E929.
- [7218] SERRANO A, PAVÓN FJ, TOVAR S, CASANUEVA F, SEÑARÍS R, DIÉGUEZ C, RODRÍGUEZ DE FONSECA F. Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology*, 2011, 60:593-601.
- [7249] MANTOVANI A. Cancer-related inflammation: the seventh hallmark of cancer. En “American Society of Clinical Oncology”, ASCO Educational Book, 2009, 723-26.
- [7257] BOECKER W. Preneoplasia of the breast. A new conceptual approach to proliferative breast disease. Saunders Elsevier, Munchen, 2006.
- [7258] SHIN ST, SIMPSON PT, DA SILVA L, JAYANTHAN J, REID L, LAKHANI SR, ROSEN PP. Molecular evidence of progression of microglandular adenosis (MGA) to invasive carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2009, 33:496-504.
- [7259] GEYER FC, KUSHNER YB, LAMBROS MB, NATRAJAN R, MACKAY A, TAMBER N, FENWICK K, PURNELL D, ASHWORTH A, WALKER AA, REIS-FILHO JS. Microglandular adenosis or microglandular adenoma? A molecular genetic analysis of a case associated with atypia and invasive carcinoma. *Histopathology*, 2009, 55:732-743.
- [7260] SIMPSON PT, REIS-FILHO JS, GALE T, LAKHANI SR. Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* 2005, 205:248-254.
- [7263] FARABEGOLI F, CHAMPEME MH, BIECHE I, SANTINI D, CECCARELLI C, DERENZINI M, LIDEREAU R. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma in situ. *J. Pathol.*, 2002, 196:280-286.
- [7264] REIS-FILHO JS and LAKHANI SR. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res.*, 2003, 5:313-319.
- [7266] BÖCKER W, MOLL R, POREMBA C, HOLLAND R, Van DIEST PJ, DERVAN P, BÜRGER H, WAI D, INA DIALLO R, BRANDT B, HERBST H, SCHMIDT A, LERCH MM, BUCHWALLOW IB. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new biological concept. *Lab. Invest.*, 2002, 82:737-746.

- [7300] CHASAN-TABER S, RIMM EB, STAMPFER MJ, SPIEGELMAN D, COLDITZ GA, GIOVANNUCCI E, ASCHERIO A and WILLETT WC. Reproducibility and validity of a self-administered physical activity questionnaire for male health professionals. *Epidemiology*, 1996, 7(1):81-6.
- [7303] FERNANDEZ-BALLART JD, PINOL JL, ZAZPE I, CORELLA D, CARRASCO P, TOLEDO E, PEREZ-BAUER M, MARTINEZ-GONZALEZ MA, SALAS-SALVADO J and MARTIN-MORENO JM. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br. J. Nutr.*, 2010, 103(12):1808-16.
- [7312] MILAGRO FI, CAMPIÓN J, GARCÍA-DÍAZ DF, GOYENECHEA E, PATERNAIN L and MARTÍNEZ JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J. Physiol. Biochem.*, 2009, 65:1-9.
- [7315] SANCHEZ-VILLEGAS A, BES-RASTROLLO M, MARTINEZ-GONZALEZ MA and SERRA-MAJEM L. Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *Int. J. Obes.*, 2006, 30(2):350-8.
- [7319] WOLF AM, HUNTER DJ, COLDITZ GA, MANSON JE, STAMPFER MJ, CORSANO KA, ROSNER B, KRISKA A and WILLETT WC. Reproducibility and validity of a self-administered physical activity questionnaire. *Int. J. Epidemiol.*, 1994, 23(5):991-9.
- [7320] MARTINEZ-GONZALEZ MA, LOPEZ-FONTANA C, VARO JJ, SANCHEZ-VILLEGAS A and MARTINEZ JA. Validation of the Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study. *Public Health Nutr.*, 2005, 8(7):920-7.
- [7321] PALA V, KROGH V, MUTI P, CHAJÈS V, RIBOLI E, MICHELI A, SAADATIAN M, SIERI S and BERRINO F. Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, 18;93(14):1088-95.
- [7323] TRICHOPOULOU A, KOURIS-BLAZOS A, WAHLQVIST ML, GNARDELLIS C, LAGIOU P, POLYCHRONOPOULOS E, VASSILAKOU T, LIPWORTH L and TRICHOPOULOS D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ.*, 1995, 311(7018):1457-60.
- [7349] HANAHAN D and WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-74.
- [7368] GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR and KARIN M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 2010, 140(6):883-99.
- [7423] LOPEZ-GARCIA MA, GETER FC, LACROIX. TRIKI M, MARCHIÓ C, REIS-FILHO JS. Breast cancer presursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*, 2010, 57:171-192.
- [7450] TOMINAGA K, FUJII S, MUKAWA K, FUJITA M, ICHIKAWA K, TOMITA S, IMAI Y, KANKE K, ONO Y, TERANO A, HIRAIISHI H and FUJIMORI T. Prediction of colorectal neoplasia by quantitative methylation analysis of estrogen receptor gene in nonneoplastic epithelium from patients with ulcerative colitis. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11(24):8880-5.
- [7452] YE Q, SHEN Y, WANG X, YANG J, MIAO F, SHEN C and ZHANG J. Hypermethylation of HLA class I gene is associated with HLA class I down-regulation in human gastric cancer. *Tissue Antigens*, 2010, 75(1):30-9.
- [7453] RAMOS EA, CAMARGO AA, BRAUN K, SLOWIK R, CAVALLI IJ, RIBEIRO EM, PEDROSA FDE O, DE SOUZA EM, COSTA FF and KLASSEN G. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. *BMC Cancer*, 2010, 10:23.
- [7455] BOLLATI V, BACCARELLI A, HOU L, BONZINI M, FUSTINONI S, CAVALLO D, BYUN HM, JIANG J, MARINELLI B, PESATORI AC, BERTAZZI PA and YANG AS. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res.*, 2007, 67(3):876-80.
- [7457] CHO YH, SHEN J, GAMMON MD, ZHANG YJ, WANG Q, GONZALEZ K, XU X, BRADSHAW PT, TEITELBAUM SL, GARBOWSKI G, HIBSHOOSH H, NEUGUT AI, CHEN J and SANTELLA RM. Prognostic significance of gene-specific promoter hypermethylation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 131(1):197-205.
- [7463] PATEL PS, SHARP SJ, JANSEN E, LUBEN RN, KHAW KT, WAREHAM NJ and FOROUHI NG. Fatty acids measured in plasma and erythrocyte-membrane phospholipids and derived by food-frequency questionnaire and the risk of new-onset type 2 diabetes: a pilot study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 92(5):1214-22.
- [7474] SUNAMI E, SHINOZAKI M, SIM MS, NGUYEN SL, VU AT, GIULIANO AE and HOON DS. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res.*, 2008, 10(3):R46.
- [7475] MOUSSAVI N, GAVINO V, RECEVEUR O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity*, 2008, 16:7-15.
- [7495] FU J, OVEISI F, GAETANI S, LIN E, PIOMELLI D. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, 2005, 48:1147-1153.

- [7517] PETERS I, REHMET K, WILKE N, KUCZYK MA, HENNENLOTTER J, EILERS T, MACHTENS S, JONAS U and SERTH J. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis. *Mol. Cancer*, 2007, 6:49.
- [7519] SIEGEL R, NAISHADHAM D and JEMAL A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.*, 2012, 62:10-29.
- [7520] RUSSO J, TAIT L, RUSSO IH. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 1983, 113:50-66.
- [7541] JARDÉ T, PERRIER S, VASSON MP and CALDEFIE-CHÉZET F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 2011, 47(1):033-43.
- [7542] JEONG YJ, BONG JG, PARK SH, CHOI JH and OH HK. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J. Breast Cancer*, 2011, 14(2):96-103.
- [7546] GROSSMANN ME, RAY A, DOGAN S, MIZUNO NK and CLEARY MP. Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth. *Cell Res.*, 2008, 18(11):1154-56.
- [7553] CHANDRAN M, PHILLIPS SA, CIARALDI T and HENRY RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. *Diabetes Care*, 2003, 26(8):2442-50.
- [7555] TERRY MB, DELGADO-CRUZATA L, VIN-RAVIV N, WU HC and SANTELLA RM. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics*, 2011, 6(7):828-37.
- [7563] SHARMA G, MIRZA S, YANG YH, PARSHAD R, HAZRAH P, DATTA GUPTA S and RALHAN R. Prognostic relevance of promoter hypermethylation of multiple genes in breast cancer patients. *Cell Oncol.*, 2009, 31(6):487-500.
- [7565] TANG FY, PAI MH and CHIANG EP. Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *J. Nutr. Biochem.*, 2012, 23(10):1302-13.
- [7614] MORRISSON BJ, SCHMIDT CW, LAKHANI SR, REYNOLDS BA, LÓPEZ JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2008, 10:210.
- [7615] SIMS AH, HOWELL A, HOWELL ST, CLARKE RB. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2007, 4:516-525.
- [7616] RUDEL RA, FENTON SE, ACKERMAN JM, EULING SY and MAKRIS SL. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ. Health Perspect.*, 2011, 119:1053-61.
- [7619] PINILLA L, AGUILAR E, DIEGUEZ C MILLAR RP and TENA-SEMPERE M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 2012, 92:1235-316.
- [7620] DA SILVA FARIA T, DA FONTE RAMOS C and SAMPAIO FJB. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J. Nutr. Biochem.*, 2004, 15:123-27.
- [7622] JARDÉ T, CALDEFIE-CHÉZET F, DAMEZ M, MISHPELLANY F, PENAULT-LLORCA F, GUILLOT J and VASSON MP. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2008, 19:905-11.
- [7624] EVANS RM, BARISH GD and WANG YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.*, 2004, 10:355-61.
- [7625] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, GARCÍA-ARELLANO A, TOLEDO E *et al.* (21 authors). A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One*, 2012, 7:e43134.
- [7627] PARSA P and PARSA B. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asoc. Pac. J. Cancer Prev.*, 2009, 10:545-50.
- [7628] HALÁSZ B, KÖVES K, MOLNÁR J, BALIKA K, STOLL V and KOVÁCS G. Hypothalamus and puberty. *Brain Res. Bull.*, 1988, 20:709-12.
- [7629] MAEDA KI, OHKURA S, UENOYAMA Y, WAKABAYASHI Y, OKA Y, TSUKAMURA H and OKAMURA H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.*, 2010, 1364:103-15.
- [7630] SANTORO N, FILICORI M and CROWLEY WF. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.*, 1986, 7:11-23.
- [7631] KELCH RP, HOPWOOD NJ, SAUDER S and MARSHALL JC. Evidence for decreased secretion of gonadotropin-releasing hormone in pubertal boys during short-term testosterone treatment. *Pediatr. Res.*, 1985, 19:112-17.
- [7632] BELCHETZ PE, PLANT TM, NAKAI Y, KEOGH EJ and KNOBIL E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 1978, 202:631-33.
- [7633] TERASAWA E, KURIAN JR, GUERREIRO KA, KENEALY BP, HUTZ ED and KEEN KL. Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J. Neuroendocrinol.*, 2010, 22:630-38.

- [7634] SISK CL, RICHARDSON HN, CHAPPELL PE and LEVINE JE. In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. *Endocrinology*, 2001, 142:2929-36.
- [7644] LEHMAN MN, COOLEN LM and GOODMAN RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 2010, 151:3479-89.
- [7646] NAVARRO VM, GOTTSCH ML, CHAVKIN C, OKAMURA H, CLIFTON DK and STEINER RA. Regulation of gonadotropin-releasing secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J. Neurosci.*, 2009, 29:11859-66.
- [7651] WAKABAYASHI Y, NAKADA T, MURATA K *et al.* (12 authors). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.*, 2010, 30:3124-32.
- [7655] LORINCZ AM and SUKUMAR S. Molecular link between obesity and breast cancer. *Endocr. Rel. Cancer*, 2006, 13:279-92.
- [7656] AHIMA RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 2006, 5:242S-48S.
- [7657] SOMASUNDAR P, McFADDEN DW, HILEMAN SM and VONA-DAVIS L. Leptin is a growth factor in cancer. *J. Surg. Res.*, 2004, 116:337-49.
- [7658] MICHALAKIS K, MINTZIORI G, KAPRARA A, TARLATZIS BC and GOULIS DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 2012, 62:457-78.
- [7663] ISHIKAWA M, KITAYAMA J and NAGAWA H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10:4325-31.
- [7664] GERELTSETSEG G, MATSUZAKI T, IWASA T, KINOUCI R, NAKAZAWA H, YAMAMOTO S, KUWAHARA A, YASUI T and IRAHARA M. Dietary in the onset of puberty of intrauterine growth retarded female rats cannot be rescued with hypernutrition after birth. *Endocr. J.*, 2012, 59:963-72.
- [7666] ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N *et al.* (19 authors). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 425:560-64.
- [7667] WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, HOTTA K, MATSUZAWA Y, PRATLEY RE and TATARANI PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86:1930-35.
- [7668] KNERR I, SCHUSTER S, NOMIKOS P, BUCHFELDER M, DÖTSCH J, SCOOF E, FAHLBUSCH R and RASCHER W. Gene expression of adrenomedullin, leptin, their receptors and neuropeptide Y in hormone-secreting and non-functioning pituitary adenomas, meningiomas and malignant intracranial tumours in humans. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2001, 27:215-22.
- [7669] WANG XJ, YUAN SL, LU Q, LU YR, ZHANG J, LIU Y and WANG WD. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2004, 10:2478-81.
- [7670] MANTZORORS C, PETRIDOU E, DESSYPRIS N, CHAVELAS C, DALAMAGA M, ALEXE DM, PADIAMANTIS Y, MARKOPOULOS C, SPANOS E, CHROUSOS G and TRICHOPOULOS D. Adiponectin and breast cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89:1102-07.
- [7671] RUSSO J and RUSSO IH. Development of the human breast. *Maturitas*, 2004, 49:2-15.
- [7672] POLLÁN M, PASTOR-BARRIUSO R, ARDANAZ E *et al.* (28 authors). Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, 101:1584-91.
- [7673] BORRÀS J, AMEIJIDE A, VILARDELL L, VALLS J, MARCOS-GRAGERA R and IZQUIERDO A. Trends in cancer incidence in Catalonia, 1985-2002. *Med. Clin. (Barc.)*, 2008, 131Suppl1:11-18.
- [7674] MARCOS-GRAGERA R, CARDÓ X, GALCERAN J, RIBES J, IZQUIERDO A and BORRÀS J. Cancer incidence in Catalonia, 1998-2002. *Med. Clin. (Barc.)*, 2008, 131Suppl1:04-10.
- [7675] TERRY PD and ROHAN TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, 11:953-71.
- [7676] GRAY J, EVANS N, TAYLOR B, RIZZO J and WALKER M. State of the evidence. The connection between breast cancer and the environment. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 2009, 15:43-78.
- [7677] DIVISI D, DI TOMMASO S, SALVEMINI S, GARRAMONE M and CRISCI R. Diet and cancer. *Acta Biomed.*, 2006, 77:118-23.
- [7678] BRODY JG and RUDEL RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ. Health Perspect.*, 2003, 111:1007-19.
- [7679] CABARAVDIC M. Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer. *Med. Arh.*, 2006, 60(6 Suppl.):97-100.

- [7681] QIN XY, ZAHA H, NAGANO R, YOSHINAGA J, YONEMOTO J and SONE H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol. Lett.*, 2011, 206:152-57.
- [7682] ARTANDI SE and DEPINHO RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 2010, 31:9-18.
- [7683] FREED-PASTOR WA and PRIVES C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.*, 2012, 26:1268-86.
- [7684] NELSON BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.*, 2008, 222:101-16.
- [7685] FERRONE C and DRANOFF G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28:4045-51.
- [7686] BINDEA G, MLECNİK B, FRIDMAN WH, PAGÈS F and GALON J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, 22:215-22.
- [7687] LYNCH HT, SNYDER C and LYNCH J. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. *Ann. Surg. Oncol.*, 2012, 19:1723-31.
- [7688] LEE EYHP and MULLER WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, 2:a003236.
- [7689] MILLER WR. Aromatase and the breast: regulation and clinical aspects. *Maturitas*, 2006, 54:335-41.
- [7692] WILLET WC. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol. Sci.*, 1999, 52:S127-S46.
- [7701] DIGIOVANNI J and JUCHAU MR. Biotransformation and bioactivation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (7,12-DMBA). *Drug Metab. Rev.*, 1980, 11:61-101.
- [7693] YANG L, PANG Y and MOSES HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, 2010, 31:220-27.
- [7694] SHIELDS JD, KOURTIS IC, TOMEI AA, ROBERTS JM and SWARTZ MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 2010, 328:749-52.
- [7695] DE NARDO DG, ANDREU P and COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29:309-16.
- [7696] QIAN BZ and POLLARD JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010, 141:39-51.
- [7697] KARNOUB AE and WEINBERG RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.*, 2006-2007, 26:75-85.
- [7698] DeBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G and THOMPSON CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, 2008, 7:11-20.
- [7699] HSU PP and SABATINI DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 2008, 134:703-07.
- [7700] JONES RG and THOMPSON CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.*, 2009, 23:537-48.
- [7788] ESTRUCH R, ROS E, SALAS-SALVADÓ J, COVAS MI, CORELLA D, ARÓS F, GÓMEZ-GRACIA E, RUIZ-GUTIÉRREZ V, FIOLE M, LAPETRA J, LAMUELA-RAVENTOS RM, SERRA-MAJEM L, PINTÓ X, BASORA J, MUÑOZ MA, SORLÍ JV, MARTÍNEZ JA, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA and PREDIMED STUDY INVESTIGATORS. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 368(14):1279-90.
- [7813] YANG AS, ESTECIO MR, DOSHI K, KONDO Y, TAJARA EH and ISSA JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(3):e38.
- [7938] STARLARD-DAVENPORT A, TRYNDYAK VP, JAMES SR, KARPf AR, LATENDRESSE JR, BELAND FA and POGRIbNY IP. Mechanisms of epigenetic silencing of the *Rassf1a* gene during estrogen-induced breast carcinogenesis in ACI rats. *Carcinogenesis*, 2010, 31(3):376-81.
- [8018] VISIOLI F and GALLI C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2002, 42(3):209-21.
- [8222] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D and BRAY F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, 2014, 136(5):E359-86.
- [8350] COUTO E, BOFFETTA P, LAGIOU P *et al.* (50 authors). Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort. *Br. J. Cancer*, 2011, 104:1493-9.
- [8353] ESCRICH E, SOLANAS M and MORAL R. Olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Cancer Treat. Res.*, 2014, 159:289-309.

- [8365] BEUNZA JJ, TOLEDO E, HU FB, BES-RASTROLLO M, SERRANO-MARTÍNEZ M, SÁNCHEZ-VILLEGAS A, MARTÍNEZ JA and MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA. Adherence to the Mediterranean diet, long-term weight change, and incident overweight or obesity: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 92(6):1484-93.
- [8415] HARDY TM and TOLLEFSBOL TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics*, 2011, 3(4):503-18.
- [8416] EDEN A, GAUDET F, WAGHMARE A and JAENISCH R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 2003, 300(5618):455.
- [8419] FRAGA MF, BALLESTAR E, VILLAR-GAREA A, BOIX-CHORNET M, ESPADA J, SCHOTTA G, BONALDI T, HAYDON C, ROPERO S, PETRIE K, IYER NG, PÉREZ-ROSADO A, CALVO E, LOPEZ JA, CANO A, CALASANZ MJ, COLOMER D, PIRIS MA, AHN N, IMHOF A, CALDAS C, JENUWEIN T and ESTELLER M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.*, 2005, 37(4):391-400.
- [8420] WEI Y, XIA W, ZHANG Z, LIU J, WANG H, ADSAY NV, ALBARRACIN C, YU D, ABBRUZZESE JL, MILLS GB, BAST RC JR, HORTOBAGYI GN and HUNG MC. Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Mol. Carcinog.*, 2008, 47(9):701-6.
- [8421] GREER EL and SHI Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.*, 2012, 13(5):343-57.
- [8422] KARIMI M, JOHANSSON S, STACH D, CORCORAN M, GRANDER D, SCHALLING M, BAKALKIN G, LYKO F, LARSSON C and EKSTROM TJ. LUMA (LUMinometric Methylation Assay)-a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp. Cell Res.*, 2006, 312(11):1989-95.
- [8425] KUTANZI K and KOVALCHUK O. Exposure to estrogen and ionizing radiation causes epigenetic dysregulation, activation of mitogen-activated protein kinase pathways, and genome instability in the mammary gland of ACI rats. *Cancer Biol. Ther.*, 2013, 14(7):564-73.
- [8427] BACHMAN KE, HERMAN JG, CORN PG, MERLO A, COSTELLO JF, CAVENEE WK, BAYLIN SB and GRAFF JR. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res.*, 1999, 59(4):798-802.
- [8428] CHODOSH LA. Expression of BRCA1 and BRCA2 in normal and neoplastic cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1998, 3(4):389-402.
- [8429] AHUJA N and ISSA JP. Aging, methylation and cancer. *Histol. Histopathol.*, 2000, 15(3):835-42.
- [8430] DI FRANCESCO A, FALCONI A, DI GERMANIO C, MICIONI DI BONAVENTURA MV, COSTA A, CARAMUTA S, DEL CARLO M, COMPAGNONE D, DAINESE E, CIFANI C, MACCARRONE M and D'ADDARIO C. Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. *J. Nutr. Biochem.*, 2015; 26(3):250-8.
- [8431] ROBERTSON KD, UZVOLGYI E, LIANG G, TALMADGE C, SUMEGI J, GONZALES FA and JONES PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27(11):2291-8.
- [8438] SANT KE, NAHAR MS and DOLINOY DC. DNA methylation screening and analysis. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 889:385-406.
- [8456] LEPAGE G and ROY CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 1986, 27(1):114-20.
- [8457] HANSMANN T, PLIUSHCH G, LEUBNER M, KROLL P, ENDT D, GEHRIG A, PREISLER-ADAMS S, WIEACKER P and HAAF T. Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 2012, 21(21):4669-79.
- [8458] GALETZKA D, HANSMANN T, EL HAJJ N, WEIS E, IRMSCHER B, LUDWIG M, SCHNEIDER-RATZKE B, KOHLSCHMIDT N, BEYER V, BARTSCH O, ZECHNER U, SPIX C and HAAF T. Monozygotic twins discordant for constitutive BRCA1 promoter methylation, childhood cancer and secondary cancer. *Epigenetics*, 2012, 7(1):47-54.
- [8459] KONISHI K, WATANABE Y, SHEN L, GUO Y, CASTORO RJ, KONDO K, CHUNG W, AHMED S, JELINEK J, BOUMBER YA, ESTECIO MR, MAEGAWA S, KONDO Y, ITOH F, IMAWARI M, HAMILTON SR and ISSA JP. DNA methylation profiles of primary colorectal carcinoma and matched liver metastasis. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27889.
- [8462] COJOCNEANU PETRIC R, BRAICU C, RADULY L, ZANOAGA O, DRAGOS N, MONROIG P, DUMITRASCU D and BERINDAN-NEAGOE I. Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone-related cancers. *Onc. Targets Ther.*, 2015, 8:2053-66.

- [8463] FIMOGNARI C, LENZI M and HRELIA P. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates and anthocyanins: mechanisms of action and structure-activity relationship. *Curr. Med. Chem.*, 2008, 15(5):440-447.
- [8464] RISO P, MARTINI D, VISIOLI F, MARTINETTI A and PORRINI M. Effect of broccoli intake on markers related to oxidative stress and cancer risk in healthy smokers and nonsmokers. *Nutr. Cancer*, 2009, 61: 232-237.
- [8465] HO E, CLARKE JD and DASHWOOD R. Dietary sulforaphane, a histone deacetylases inhibitor for cancer prevention. *J. Nutr.*, 2009,139:2393-2396.
- [8466] ZHANG Y, KENSLER TW, CHO CG, POSNER GH and TALALAY P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1994, 91(8):3147-50.
- [8467] GOO YA, LI Z, PAJKOVIC N, SHAFFER S, TAYLOR G, CHEN J, CAMPBELL D, ARNSTEIN L, GOODLETT DR and VAN BREEMEN RB. Systematic investigation of lycopene effects in LNCaP cells by use of novel large-scale proteomic analysis software. *Proteomics Clin. Appl.*, 2007, 1(5):513-523.
- [8468] QIU X, YUAN Y, VAISHNAV A, TESSEL MA, NONN L and VAN BREEMEN RB. Effects of lycopene on protein expression in human primary prostatic epithelial cells. *Cancer Prev. Res.*, 2013, 6(5):419-27.
- [8469] SHARONI Y, LINNEWIEL-HERMONI K, ZANGO G, KHANIN M, SALMAN H, VEPRIK A, DANILENKO M and LEVY J. The role of lycopene and its derivatives in the regulation of transcription systems: implications for cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2012, 96(5):1173S-8S.
- [8470] VELIE EM, SCHAIRER C, FLOOD A, HE JP, KHATTREE R and SCHATZKIN A. Empirically derived dietary patterns and risk of postmenopausal breast cancer in a large prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 82(6):1308-19.
- [8471] MALIN AS, QI D, SHU XO, GAO YT, FRIEDMANN JM, JIN F and ZHENG W. Intake of fruits, vegetables and selected micronutrients in relation to the risk of breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2003, 105:413-418.
- [8472] BESSAOUD F, DAURES JP and GERBER M. Dietary factors and breast cancer risk: a case control study among a population in Southern France. *Nutr. Cancer*, 2008, 60:177-187.
- [8473] MATTISSON I, WIRFÄLT E, JOHANSSON U, GULLBERG B, OLSSON H and BERGLUND G. Intakes of plant foods, fibre and fat and risk of breast cancer - a prospective study in the Malmo Diet and Cancer cohort. *Br. J. Cancer*, 2004, 90:122-127.
- [8474] AGURS-COLLINS T, ROSENBERG L, MAKAMBI K, PALMER JR and ADAMS-CAMPBELL L. Dietary patterns and breast cancer risk in women participating in the Black Women's Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, 90:621-628.
- [8475] SIERI S, KROGH V, BOLELLI G, ABAGNATO CA, GRIONI S, PALA V, EVANGELISTA A, ALLEMANI C, MICHELI A, TAGLIABUE G, SCHUNEMANN HJ, MENARD S, BERRINO F and MUTI P. Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18:169-176.
- [8476] TERRY P, SUZUKI R, HU FB and WOLK A. A prospective study of major dietary patterns and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001, 10:1281-1285.
- [8477] ADEBAMOWO CA, HU FB, CHO E, SPIEGELMAN D, HOLMES MD and WILLETT WC. Dietary patterns and the risk of breast cancer. *Ann. Epidemiol.*, 2005, 15:789-795.
- [8478] LISSOWSKA J, GAUDET MM, BRINTON LA, PEPLONSKA B, SHERMAN M, SZESZENIA-DABROWSKA N, ZATONSKI W and GARCIA-CLOSAS M. Intake of fruits, and vegetables in relation to breast cancer risk by hormone receptor status. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2008, 107:113-117.
- [8479] OLSEN A, TJØNNELAND A, THOMSEN BL, LOFT S, STRIPP C, OVERVAD K, MØLLER S and OLSEN JH. Fruits and vegetables intake differentially affects estrogen receptor negative and positive breast cancer incidence rates. *J. Nutr.*, 2003,133:2342-2347.
- [8480] FUNG TT, HU FB, MCCULLOUGH ML, NEWBY PK, WILLETT WC and HOLMES MD. Diet quality is associated with the risk of estrogen receptor-negative breast cancer in postmenopausal women. *J. Nutr.*, 2006, 136:466-472.
- [8481] COTTET V, TOUVIER M, FOURNIER A, TOUILLAUD MS, LAFAY L, CLAVEL-CHAPELON F and BOUTRON-ROUAULT MC. Postmenopausal breast cancer risk and dietary patterns in the E3N-EPIC prospective cohort study. *Am. J. Epidemiol.*, 2009,170:1257-1267.
- [8482] CUI X, DAI Q, TSENG M, SHU XO, GAO YT and ZHENG W. Dietary patterns and breast cancer risk in the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007,16:1443-1448.
- [8483] HIROSE K, MATSUO K, IWATA H and TAJIMA K. Dietary patterns and the risk of breast cancer in Japanese women. *Cancer Sci.*, 2007, 98:1431-1438.

- [8484] VELIE EM, SCHAIRER C, FLOOD A, HE JP, KHATTREE R and SCHATZKIN A. Empirically derived dietary patterns and risk of postmenopausal breast cancer in a large prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 82:1308-1319.
- [8485] LARSSON SC, BERGKVIST L and WOLK A. Long-term meat intake and risk of breast cancer by oestrogen and progesterone receptor status in a cohort of Swedish women. *Eur. J. Cancer.*, 2009, 45:3042-3046.
- [8486] BOUILLET T, BIGARD X, BRAMI C, CHOUAHNIA K, COPEL L, DAUCHY S, DELCAMBRE C, DESCOTES JM, JOLY F, LEPEU G, MARRE A, SCOTTE F, SPANO JP, VANLEMMENS L and ZELEK L. Role of physical activity and sport in oncology: scientific commission of the National Federation Sport and Cancer CAMI. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2015, 94(1):74-86.
- [8487] WADDINGTON CH. *An introduction to modern genetics*. The Macmillan Company, New York, 1939.
- [8488] PORTELA A and ESTELLER M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28(10):1057-68.
- [8489] BISHOP KS and FERGUSON LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients*, 2015, 7(2):922-47.
- [8490] VAVOURI T and LEHNER B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol.*, 2012, 13(11):R110.
- [8491] CURRADI M, IZZO A, BADARACCO G and LANDSBERGER N. Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation. *Mol. Cell Biol.*, 2002, 22(9): 3157-3173.
- [8492] NAKAO M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 2001, 278: 25-31.
- [8493] O'NEILL RJW, ONEILL MJ and GRAVES JAM. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodeling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature*, 1998, 393: 68-72.
- [8494] AAPOLA U, LIIV I and PETERSON P. Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(16):3602-8.
- [8495] DEPLUS R, BRENNER C, BURGERS WA, PUTMANS P, KOUZARIDES T, DE LAUNOIT Y and FUKS F. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(17):3831-8.
- [8496] JIN B, LI Y and ROBERTSON KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?. *Genes Cancer*, 2011, 2(6): 607-617.
- [8497] WANG KY, CHEN CC and SHEN CK. Active DNA demethylation of the vertebrate genomes by DNA methyltransferases: deaminase, dehydroxymethylase or demethylase?. *Epigenomics*, 2014, 6(3):353-63.
- [8498] BURGESS RJ and ZHANG Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013, 20(1):14-22.
- [8499] STRAHL BD and ALLIS CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403(6765):41-5.
- [8500] BANNISTER AJ and KOUZARIDES T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, 2011, 21(3): 381-395.
- [8501] SAWAN C and HERCEG Z. Histone modifications and cancer. *Adv. Genet.*, 2010, 70:57-85.
- [8502] NARLIKAR GJ, SUNDARAMOORTHY R, OWEN-HUGHES T. Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell*, 2013, 154(3):490-503.
- [8503] CLAPIER CR and CAIRNS BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, 78:273-304.
- [8504] LÄNGST G and MANELYTE L. Chromatin Remodelers: From Function to Dysfunction. *Genes*, 2015, 6(2): 299-324.
- [8505] GUIL S and ESTELLER M. RNA-RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players. *Trends Biochem. Sci.*, 2015, 40(5):248-56.
- [8506] SANA J, FALTEJSKOVA P, SVOBODA M and SLABY O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J. Transl. Med.*, 2012, 10:103.
- [8507] FARH KK, GRIMSON A, JAN C, LEWIS BP, JOHNSTON WK, LIM LP, BURGE CB and BARTEL DP. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 2005, 310:1817-1821.
- [8508] KROL J, LOEDIGE I and FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, 11:597-610.
- [8509] BARTEL DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2):215-33.
- [8510] SINGH R and MO YY. Role of microRNAs in breast cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 2013, 14(3): 201-212.

- [8511] KADRI S, HINMAN V and BENOS PV. HHMMiR: efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(Suppl 1): S35.
- [8512] HAMM CA and COSTA FF. Epigenomes as therapeutic targets. *Pharmacol. Ther.*, 2015, 151:72-86.
- [8513] MOORE LD, LE T and FAN G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1):23-38.
- [8514] CEDAR H and BERGMAN Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10:295-304.
- [8515] ROSE NR and KLOSE RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1839(12):1362-1372.
- [8516] NAN X, NG HH, JOHNSON CA, LAHERTY CD, TURNER BM, EISENMAN RN and BIRD A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 1998, 393(6683):386-9.
- [8517] HENDRICH B and BIRD A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18:6538-6547.
- [8518] BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, 2002, 16(1):6-21.
- [8519] GHOSH AK, STEELE R and RAY RB. MBP-1 physically associates with histone deacetylase for transcriptional repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 260(2):405-9.
- [8520] FUKS F, HURD PJ, DEPLUS R and KOUZARIDES T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31: 2305-2312.
- [8521] FUKS F, BURGERS WA, BREHM A, HUGHES-DAVIES L and KOUZARIDES T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat. Genet.*, 2000, 24: 88-91.
- [8522] GARZON R, LIU S, FABBRI M *et al.* (19 authors). MicroRNA -29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 2009, 113: 6411-6418.
- [8523] MOHAMMAD F, MONDAL T, GUSEVA N, PANDEY GK and KANDURI C. Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development*, 2010, 137: 2493-2499.
- [8524] UMLAUF D, GOTO Y, CAO R, CERQUEIRA F, WAGSCHAL A, ZHANG Y and FEIL R. Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nature Genetics*, 2004, 36:1296 - 1300.
- [8525] ZHENG Q, ROWLEY MJ, BÖHMENDORFER G, SANDHU D, GREGORY BD and WIERZBICKI AT. RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J.*, 2013, 73(2):179-89.
- [8526] ZHONG X, HALE CJ, LAW JA, JOHNSON LM, FENG S, TU A and JACOBSEN SE. DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012, 19: 870-875.
- [8527] FEINBERG AP and VOGELSTEIN B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 1983, 301: 89-92.
- [8528] JELINIC P and SHAW P. Loss of imprinting and cancer. *J. Pathol.*, 2007, 211(3):261-8.
- [8529] ESTELLER M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*, 2006, 27(6):1121-5.
- [8530] CUI H, CRUZ-CORREA M, GIARDIELLO FM, HUTCHEON DF, KAFONEK DR, BRANDENBURG S, WU Y, HE X, POWE NR and FEINBERG AP. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*, 2003, 299(5613):1753-5.
- [8531] FEINBERG AP, OHLSSON R and HENIKOFF S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.*, 2006, 7(1):21-33.
- [8532] KO M, HUANG Y, JANKOWSKA AM, PAPE UJ, TAHILIANI M, BANDUKWALA HS, AN J, LAMPERTI ED, KOH KP, GANETZKY R, LIU XS, ARAVIND L, AGARWAL S, MACIEJEWSKI JP and RAO A. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 2010, 468(7325):839-43.
- [8533] SCOURZIC L, MOULY E and BERNARD OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med.*, 2015, 7(1):9.
- [8535] LI L, LEE KM, HAN W, CHOI JY, LEE JY, KANG GH, PARK SK, NOH DY, YOO KY and KANG D. Estrogen and progesterone receptor status affect genome-wide DNA methylation profile in breast cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 2010, 19(21):4273-7.

- [8536] HILL VK, RICKETTS C, BIECHE I, VACHER S, GENTLE D, LEWIS C, MAHER ER and LATIF F. Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. *Cancer Res.*, 2011, 71(8):2988-99.
- [8537] FANG F, TURCAN S, RIMNER A, KAUFMAN A, GIRI D, MORRIS LG, SHEN R, SESHAN V, MO Q, HEGUY A, BAYLIN SB, AHUJA N, VIALE A, MASSAGUE J, NORTON L, VAHDAT LT, MOYNAHAN ME and CHAN TA. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci. Transl. Med.*, 2011, 3(75):75ra25.
- [8538] SZYF M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Med.*, 2012,4(3):26.
- [8539] GIRAULT I, TOZLU S, LIDEREAU R and BIECHE I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9(12):4415-22.
- [8540] ROLL JD, RIVENBARK AG, JONES WD and COLEMAN WB. DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer.*, 2008, 7:15.
- [8541] SUBRAMANIAM D, THOMBRE R, DHAR A and ANANT S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.*, 2014, 4:80.
- [8542] APPLETON K, MACKAY HJ, JUDSON I, PLUMB JA, MCCORMICK C, STRATHDEE G, LEE C, BARRETT S, READE S, JADAYEL D, TANG A, BELLENGER K, MACKAY L, SETANOIANS A, SCHÄTZLEIN A, TWELVES C, KAYE SB and BROWN R. Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2007,25:4603-4609.
- [8543] SAMUELS BL, HERNDON JE, HARMON DC, CAREY R, AISNER J, CORSON JM, SUZUKI Y, GREEN MR and VOGELZANG NJ. Dihydro-5-azacytidine and cisplatin in the treatment of malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B. *Cancer*, 1998, 82:1578-1584.
- [8544] TAO Q, YOUNG LS, WOODMAN CB and MURRAY PG. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers-genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front Biosci.*, 2006, 11:2672-2713.
- [8545] ISSA JP, KANTARJIAN HM and KIRKPATRICK P. Azacitidine. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, 4:275-276.
- [8546] ELSHEIKH SE, GREEN AR, RAKHA EA, POWE DG, AHMED RA, COLLINS HM, SORIA D, GARIBALDI JM, PAISH CE, AMMAR AA, GRAINGE MJ, BALL GR, ABDELGHANY MK, MARTINEZ-POMARES L, HEERY DM and ELLIS IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.*, 2009, 69(9):3802-9.
- [8547] BARLÉSI F, GIACCONE G, GALLEGOS-RUIZ MI, LOUNDOU A, SPAN SW, LEFESVRE P, KRUYT FA and RODRIGUEZ JA. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25(28):4358-64.
- [8548] PFISTER S, REA S, TAIPALE M, MENDRZYK F, STRAUB B, ITTRICH C, THUERIGEN O, SINN HP, AKHTAR A and LICHTER P. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. *Int. J. Cancer.*, 2008,122(6):1207-13.
- [8549] VARAMBALLY S, DHANASEKARAN SM, ZHOU M, BARRETTE TR, KUMAR-SINHA C, SANDA MG, GHOSH D, PIENTA KJ, SEWALT RG, OTTE AP, RUBIN MA and CHINNAIYAN AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 2002, 19(6907):624-9.
- [8550] VISSER HP, GUNSTER MJ, KLUIN-NELEMANS HC, MANDERS EM, RAAPHORST FM, MEIJER CJ, WILLEMZE R and OTTE AP. The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 2001, 112: 950-958.
- [8551] KLEER CG, CAO Q, VARAMBALLY S, SHEN R, OTA I, TOMLINS SA, GHOSH D, SEWALT RG, OTTE AP, HAYES DF, SABEL MS, LIVANT D, WEISS SJ, RUBIN MA and CHINNAIYAN AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100:11606-11611.
- [8552] PAOLICCHI E, CREA F, FARRAR WL, GREEN JE and DANESI R. Histone lysine demethylases in breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2013, 86(2):97-103.
- [8553] SZYF M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009, 49:243-263.
- [8554] YANG X, FERGUSON AT, NASS SJ, PHILLIPS DL, BUTASH KA, WANG SM, HERMAN JG and DAVIDSON NE. Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.*, 2000, 60(24):6890-4.
- [8555] SOUBRY A, MURPHY SK, WANG F, HUANG Z, VIDAL AC, FUEMMELER BF, KURTZBERG J, MURTHA A, JIRTLE RL, SCHILDKRAUT JM and HOYO C. Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int. J. Obes. (Lond)*, 2015, 39(4):650-7.

- [8556] RAMPERSAUD GC, KA UWELL GP, HUTSON AD, CERDA JJ and BAILEY LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, 72:998-1003.
- [8557] JIRTLE RL and SKINNER MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.*, 2007, 8(4):253-62.
- [8558] LOENEN WA. S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, 34:330-333.
- [8559] KIM YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J. Nutr. Biochem.*, 1999, 10(2):66-88.
- [8560] KIM YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004, 13(4):511-9.
- [8561] VAN ENGELAND M, WEIJENBERG MP, ROEMEN GM, BRINK M, DE BRUÏNE AP, GOLDBOHN RA, VAN DEN BRANDT PA, BAYLIN SB, DE GOEIJ AF and HERMAN JG. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Res.*, 2003, 63(12):3133-7.
- [8562] TRASLER J, DENG L, MELNYK S, POGRIBNY I, HIOU-TIM F, SIBANI S, OAKES C, LI E, JAMES SJ and ROZEN R. Impact of Dnmt1 deficiency, with and without low folate diets, on tumor numbers and DNA methylation in Min mice. *Carcinogenesis*, 2003, 24(1):39-45.
- [8563] DEMINICE GV, PORTARI JS, MARCHINI H, VANNUCCHI AA and JORDAO. Effects of a low-protein diet on plasma amino acid and homocysteine levels and oxidative status in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 2009, 54: 202-207.
- [8564] JIMÉNEZ-CHILLARÓN JC, DÍAZ R, MARTÍNEZ D, PENTINAT T, RAMÓN-KRAUEL M, RIBÓ S and PLÖSCH T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie.*, 2012, 94(11):2242-63.
- [8565] LU H, MENG X, LI C, SANG S, PATTEN C, SHENG S, HONG J, BAI N, WINNIK B, HO CT and YANG CS. Glucuronides of tea catechins: enzymology of biosynthesis and biological activities. *Drug Metab. Dispos.*, 2003, 31:452-461.
- [8566] LI Y, YUAN YY, MEERAN S and TOLLEFSBOL T. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative breast cancer cells. *Mol. Cancer.*, 2010, 9(1):274.
- [8567] PAPOUTSIS AJ, LAMORE SD, WONDRAK GT, SELMIN OI and ROMAGNOLO DF. Resveratrol prevents epigenetic silencing of BRCA-1 by the aromatic hydrocarbon receptor in human breast cancer cells. *J. Nutr.*, 2010, 140(9):1607-1614.
- [8568] LI Y, LIU L, ANDREWS LG and TOLLEFSBOL TO. Genistein depletes telomerase activity through crosstalk between genetic and epigenetic mechanisms. *Int. J. Cancer*, 2009, 125(2):286-296.
- [8569] XIE Q, BAI Q, ZOU LY, ZHANG QY, ZHOU Y, CHANG H, YI L, ZHU JD and MI MT. Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(5):422-31.
- [8570] MYZAK MC, HARDIN K, WANG R, DASHWOOD RH and HO E. Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*, 2006, 27:811-819.
- [8571] NIAN H, DELAGE B, HO E and DASHWOOD RH. Modulation of histone deacetylases activity by dietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds. *Environ. Mol. Mutagen*, 2009, 50: 213-221.
- [8572] DASHWOOD RH and HO E. Dietary histone deacetylase inhibitors: from cells to mice to man. *Semin. Cancer Biol.*, 2007, 17: 363-369.
- [8573] MEERAN S, PATEL S and TOLLEFSBOL T. Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. *PLoS One*, 2010, 5:e11457.
- [8574] MYZAK M, TONG P, DASHWOOD W, DASHWOOD R and HO E. Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. *Exp. Biol. Med.*, 2007, 232:227-234.
- [8575] SARVESWARAN S, LIROFF J, ZHOU Z, NIKITIN AY and GHOSH J. Selenite triggers rapid transcriptional activation of p53, and p53-mediated apoptosis in prostate cancer cells: Implication for the treatment of early-stage prostate cancer. *Int. J. Oncol.*, 2010, 36(6):1419-28.
- [8576] DAVIS C, UTHUS E and FINLEY J. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in Caco-2 cells and in vivo in rat liver and colon. *J. Nutr.*, 2000, 130:2903-2909.
- [8577] BARRERA L, CASSIDY A, JOHNSON I, BAO Y and BELSHAW N. Epigenetic and antioxidant effects of dietary isothiocyanates and selenium: potential implications for cancer chemoprevention. *Proc. Nutr. Soc.*, 2012, 6: 1-9.

- [8578] DAVIS CD and UTHUS EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp. Biol. Med.*, 2004, 229(10):988-95.
- [8579] XIANG N, ZHAO R, SONG G and ZHONG W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008, 29(11):2175-81.
- [8580] DAVIS CD and UTHUS EO. Dietary selenite and azadeoxycytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. *J. Nutr.*, 2002, 132(2):292-7.
- [8581] PILSNER JR, HALL MN, LIU X, AHSAN H, ILIEVSKI V, SLAVKOVICH V, LEVY D, FACTOR-LITVAK P, GRAZIANO JH and GAMBLE MV. Associations of plasma selenium with arsenic and genomic methylation of leukocyte DNA in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.*, 2011, 119(1):113-8.
- [8582] KING-BATOON A, LESZCZYNSKA JM and KLEIN CB. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2008, 49(1):36-45.
- [8583] FU LJ, DING YB, WU LX, WEN CJ, QU Q, ZHANG X and ZHOU HH. The Effects of Lycopene on the Methylation of the GSTP1 Promoter and Global Methylation in Prostatic Cancer Cell Lines PC3 and LNCaP. *Int. J. Endocrinol.*, 2014, 2014:620165.
- [8584] NICULESCU MD, LUPU DS and CRACIUNESCU CN. Perinatal manipulation of α -linolenic acid intake induces epigenetic changes in maternal and offspring livers. *FASEB J.*, 2013, 27(1):350-8.
- [8585] NICULESCU MD, LUPU DS and CRACIUNESCU CN. Maternal α -linolenic acid availability during gestation and lactation alters the postnatal hippocampal development in the mouse offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2011, 29(8):795-802.
- [8586] HOILE SP, IRVINE NA, KELSALL CJ, SIBBONS C, FEUNTEUN A, COLLISTER A, TORRENS C, CALDER PC, HANSON MA, LILLYCROP KA and BURDGE GC. Maternal fat intake in rats alters 20: 4n-6 and 22: 6n-3 status and the epigenetic regulation of Fads2 in offspring liver. *J. Nutr. Biochem.*, 2012, 24(7):1213-20.
- [8587] HOILE SP, CLARKE-HARRIS R, HUANG RC, CALDER PC, MORI TA, BEILIN LJ, LILLYCROP KA and BURDGE GC. Supplementation with N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids or olive oil in men and women with renal disease induces differential changes in the DNA methylation of FADS2 and ELOVL5 in peripheral blood mononuclear cells. , 2014, 9(10):e109896.
- [8588] WIDIKER S, KARST S, WAGENER A and BROCKMANN GA. High-fat diet leads to a decreased methylation of the Mc4r gene in the obese BFMI and the lean B6 mouse lines. *J. Appl. Genet.*, 2010, 51:193-197.
- [8589] FUNATO H, ODA S, YOKOFUJITA J, IGARASHI H and KURODA M. Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS One*, 2011, 6:e18950.
- [8590] ONG TP, MORENO FS and ROSS SA. Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*, 2011, 4(5):275-92.
- [8591] DASHWOOD RH, MYZAK MC and HO E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis*, 2006, 27(2):344-9.
- [8592] CHEN YX, FANG JY, ZHU HY, LU R, CHENG ZH and QIU DK. Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. *World J. Gastroenterol.*, 2004, 10(18):2643-6.
- [8593] LU R, WANG X, SUN DF, TIAN XQ, ZHAO SL, CHEN YX and FANG JY. Folic acid and sodium butyrate prevent tumorigenesis in a mouse model of colorectal cancer. *Epigenetics*, 2008, 3(6):330-5.
- [8594] ZHANG Y, WANG W, YANG X and HELFERICH WG. High fat diet induced DNA methylation at transcription factor binding region and repressed gene expression of a metastasis suppressor E-cadherin in primary site of murine metastatic breast cancer (MBC), and promoted invasion of MBC cells to lung and liver. *Cancer Res.*, 2015, 75:899.
- [8595] ZHANG FF, MORABIA A, CARROLL J, GONZALEZ K, FULDA K, KAUR M, VISHWANATHA JK, SANTELLA RM and CARDARELLI R. Dietary patterns are associated with levels of global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *J. Nutr.*, 2011, 141:1165-1171.
- [8596] MCGEE SL, FAIRLIE E, GARNHAM AP and HARGREAVES M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J. Physiol.*, 2009, 587:5951-8.
- [8597] ELSNER VR, LOVATEL GA, BERTOLDI K, VANZELLA C, SANTOS FM, SPINDLER C, DE ALMEIDA EF, NARDIN P and SIQUEIRA IR. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience*, 2011, 192:580-587.
- [8598] COYLE YM, XIE XJ, LEWIS CM, BU D, MILCHGRUB S and EUHUS DM. Role of physical activity in modulating breast cancer risk as defined by APC and RASSF1A promoter hypermethylation in nonmalignant breast tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, 16:192-196.
- [8599] ZHANG FF, CARDARELLI R, CARROLL J, FULDA KG, KAUR M, GONZALEZ K, VISHWANATHA JK, SANTELLA RM and MORABIA A. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics*, 2011, 6: 623-629.

- [8600] GOMES MV, TOFFOLI LV, ARRUDA DW, SOLDERA LM, PELOSI GG, NEVES-SOUZA RD, FREITAS ER, CASTRO DT and MARQUEZ AS. Age-related changes in the global DNA methylation profile of leukocytes are linked to nutrition but are not associated with the MTHFR C677T genotype or to functional capacities. *PLoS One*, 2012, 7: e52570.
- [8601] PEARCE MS, MCCONNELL JC, POTTER C, BARRETT LM, PARKER L, MATHERS JC and RELTON CL. Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. *Int. J. Epidemiol.*, 2012, 41: 210-217.
- [8602] ZHANG F, SANTELLA R and WOLFF M. White blood cell global methylation and IL-6 promoter methylation in association with diet and lifestyle risk factors in a cancer-free population. *Epigenetics*, 2012, 7: 606-614.
- [8603] ULRICH CM, TORIOLA AT, KOEPL LM, SANDIFER T, POOLE EM, DUGGAN C, MCTIERNAN A and ISSA JP. Metabolic, hormonal and immunological associations with global DNA methylation among postmenopausal women. *Epigenetics*, 2012, 7:1020-1028.
- [8604] FIGUEIREDO JC, GRAU MV, WALLACE K, LEVINE AJ, SHEN L, HAMDAN R, CHEN X, BRESALIER RS, MCKEOWN-EYSSSEN G, HAILE RW, BARON JA and ISSA JP. Global DNA hypomethylation (LINE-1) in the normal colon and lifestyle characteristics and dietary and genetic factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18:1041-1049.
- [8605] NOMURA Y, LAMBERTINI L, RIALDI A, LEE M, MYSTAL EY, GRABIE M, MANASTER I, HUYNH N, FINIK J, DAVEY M, DAVEY K, LY J, STONE J, LOUDON H, EGLINTON G, HURD Y, NEWCORN JH and CHEN J. Global methylation in the placenta and umbilical cord blood from pregnancies with maternal gestational diabetes, preeclampsia, and obesity. *Reprod. Sci.*, 2014, 21(1):131-7.
- [8606] JINTARIDTH P, TUNGTRONGCHITR R, PREUTTHIPAN S and MUTIRANGURA A. Hypomethylation of alu elements in post-menopausal women with osteoporosis. *PLoS One*, 2013, 8: e70386.
- [8607] PIYATHILAKE CJ, BADIGA S, ALVAREZ RD, PARTRIDGE EE and JOHANNING GL. A lower degree of PBMC L1 methylation is associated with excess body weight and higher HOMA-IR in the presence of lower concentrations of plasma folate. *PLoS One*, 2013, 8:e54544.
- [8608] JUFVAS A, SJÖDIN S, LUNDQVIST K, AMIN R, VENER AV and STRÅLFORS P. Global differences in specific histone H3 methylation are associated with overweight and type 2 diabetes. *Clin. Epigenetics*, 2013, 5:15.
- [8609] VAN DIJK SJ, MOLLOY PL, VARINLI H, MORRISON JL and MUHLHAUSLER BS. Epigenetics and human obesity. *International Journal of Obesity*, 2015, 39, 85-97.
- [8610] HERMSDORFF HH, MANSEGO ML, CAMPIÓN J, MILAGRO FI, ZULET MA and MARTÍNEZ JA. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*, 2013, 64:265-271.
- [8611] KUEHNEN P, MISCHKE M, WIEGAND S, SERS C, HORSTHEMKE B, LAU S, KEIL T, LEE YA, GRUETERS A and KRUDE H. An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet.*, 2012, 8:e1002543.
- [8612] HAIR BY, TROESTER MA, EDMISTON SN, PARRISH EA, ROBINSON WR, WU MC, OLSHAN AF, SWIFT-SCANLAN T and CONWAY K. Body mass index is associated with gene methylation in estrogen receptor-positive breast tumors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2015, 24(3):580-6.
- [8613] TAO MH, MARIAN C, NIE J, AMBROSONE C, KRISHNAN SS, EDGE SB, TREVISAN M, SHIELDS PG and FREUDENHEIM JL. Body mass and DNA promoter methylation in breast tumors in the Western New York Exposures and Breast Cancer Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011, 94(3):831-8.
- [8614] LIU F, KILLIAN JK, YANG M, WALKER RL, HONG JA, ZHANG M, DAVIS S, ZHANG Y, HUSSAIN M, XI S, RAO M, MELTZER PA and SCHRUMP DS. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene*, 2010, 29(25):3650-64.
- [8615] MARWICK JA, KIRKHAM PA, STEVENSON CS, DANAHAY H, GIDDINGS J, BUTLER K, DONALDSON K, MACNEE W and RAHMAN I. Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, 31(6):633-42.
- [8616] ZHU ZZ, HOU L, BOLLATI V, TARANTINI L, MARINELLI B, CANTONE L, YANG AS, VOKONAS P, LISSOWSKA J, FUSTINONI S, PESATORI AC, BONZINI M, APOSTOLI P, COSTA G, BERTAZZI PA, CHOW WH, SCHWARTZ J and BACCARELLI A. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int. J. Epidemiol.*, 2012, 41(1):126-39.
- [8617] BLEICH S, LENZ B, ZIEGENBEIN M, BEUTLER S, FRIELING H, KORNHUBER J and BÖNSCH D. Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces down-regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2006, 30(4):587-91.
- [8618] ZHU K, DAVIDSON NE, HUNTER S, YANG X, PAYNE-WILKS K, ROLAND CL, PHILLIPS D, BENTLEY C, DAI M and WILLIAMS SM. Methyl-group dietary intake and risk of breast cancer among African-American women:

- a case-control study by methylation status of the estrogen receptor alpha genes. *Cancer Causes Control*, 2003, 14(9):827-36.
- [8619] TAO MH, MARIAN C, SHIELDS PG, NIE J, MCCANN SE, MILLEN A, AMBROSONE C, HUTSON A, EDGE SB, KRISHNAN SS, XIE B, WINSTON J, VITO D, RUSSELL M, NOCHAJSKI TH, TREVISAN M and FREUDENHEIM JL. Alcohol consumption in relation to aberrant DNA methylation in breast tumors. *Alcohol*, 2011, 45(7):689-99.
- [8620] XING C, WANG QF, LI B, TIAN H, NI Y, YIN S and LI G. Methylation and expression analysis of tumor suppressor genes p15 and p16 in benzene poisoning. *Chem. Biol. Interact.*, 2010, 184(1-2):306-9.
- [8621] CHANDA S, DASGUPTA UB, GUHAMAZUMDER D, GUPTA M, CHAUDHURI U, LAHIRI S, DAS S, GHOSH N and CHATTERJEE D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol. Sci.*, 2006, 89(2):431-7.
- [8622] WRIGHT RO, SCHWARTZ J, WRIGHT RJ, BOLLATI V, TARANTINI L, PARK SK, HU H, SPARROW D, VOKONAS P and BACCARELLI A. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ. Health Perspect.*, 2010, 118(6):790-5.
- [8623] ANWAY MD, CUPP AS, UZUMCU M and SKINNER MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 2005, 308(5727):1466-9.
- [8624] WENG YI, HSU PY, LIYANARACHCHI S, LIU J, DEATHERAGE DE, HUANG YW, ZUO T, RODRIGUEZ B, LIN CH, CHENG AL and HUANG TH. Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, 248(2):111-21.
- [8625] DOHERTY LF, BROMER JG, ZHOU Y, ALDAD TS and TAYLOR HS. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm. Cancer*, 2010, 1(3):146-55.
- [8626] KNOWER KC, TO SQ, LEUNG YK, HO SM and CLYNE CD. Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. *Endocr. Relat. Cancer*, 2014, 21(2):T33-55.
- [8627] PAPOUTSIS AJ, SELMIN OI, BORG JL and ROMAGNOLO DF. Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: preventive effects of resveratrol. *Mol. Carcinog.*, 2015, 54(4):261-9.
- [8629] CONOVER CA, LEE PD, KANALEY JA, CLARKSON JT and JENSEN MD. Insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in obese and nonobese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992, 74:1355-1360.
- [8630] KAAKS R. Nutrition, insulin, IGF-1 metabolism and cancer risk: a summary of epidemiological evidence. *Novartis Found. Symp.*, 2004, 262:247-260; discussion 260-268.
- [8631] HELLE SI and LONNING PE. Insulin-like growth factors in breast cancer. *Acta Oncol.*, 1996, 35:19-22.
- [8632] PAPA V, PEZZINO V, COSTANTINO A, BELFIORE A, GIUFFRIDA D, FRITTITTA L, VANNELLI GB, BRAND R, GOLDFINE ID and VIGNERI R. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 1990, 86:1503-1510.
- [8633] YU H, SHU XO, LI BD, DAI Q, GAO YT, JIN F and ZHENG W. Joint effect of insulin-like growth factors and sex steroids on breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003, 12:1067-1073.
- [8634] TONIOLO P, BRUNING PF, AKHMEDKHANOV A, BONFRER JM, KOENIG KL, LUKANOVA A, SHORE RE and ZELENIUCH-JACQUOTTE A. Serum insulin-like growth factor-I and breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2000, 88:828-832.
- [8635] YU H, JIN F, SHU XO, LI BD, DAI Q, CHENG JR, BERKEL HJ and ZHENG W. Insulin-like growth factors and breast cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, 11:705-712.
- [8636] YEE D and LEE AV. Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2000, 5:107-115.
- [8637] ROMIEU I, FERRARI P, RINALDI S *et al.* (42 authors). Dietary glycemic index and glycemic load and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am. J. Clin. Nutr.*, 2012, 96:345-355.
- [8638] SHIKANY JM, REDDEN DT, NEUHOUSER ML, CHLEBOWSKI RT, ROHAN TE, SIMON MS, LIU S, LANE DS and TINKER L. Dietary glycemic load, glycemic index, and carbohydrate and risk of breast cancer in the Women's Health Initiative. *Nutr. Cancer*, 2011, 63:899-907.
- [8639] SILVERA SA, JAIN M, HOWE GR, MILER AB and ROHAN TE. Dietary carbohydrates and breast cancer risk: a prospective study of the roles of overall glycemic index and glycemic load. *Int. J. Cancer*, 2005, 114:653-658.
- [8640] YUN SH, KIM K, NAM SJ, KONG G and KIM MK. The association of carbohydrate intake, glycemic load, glycemic index, and selected rice foods with breast cancer risk: a case-control study in South Korea. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2010, 19:383-392.

- [8641] ROMIEU I, LAZCANO-PONCE E, SANCHEZ-ZAMORANO LM, WILLETT W and HERNANDEZ-AVILA M. Carbohydrates and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004, 13:1283-1289.
- [8642] LAJOUS M, WILLETT W, LAZCANO-PONCE E, SANCHEZ-ZAMORANO LM, HERNANDEZ-AVILA M and ROMIEU I. Glycemic load, glycemic index, and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Cause Control*, 2005, 16:1165-1169.
- [8643] SIERI S, PALA V, BRIGHENTI F, PELLEGRINI N, MUTI P, MICHELI A, EVANGELISTA A, GRIONI S, CONTIERO P, BERRINO F, KROGH V. Dietary glycemic index, glycemic load, and the risk of breast cancer in an Italian prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007, 86:1160-1166.
- [8644] WEN W, SHU XO, LI H, YANG G, JI BT, CAI H, GAO YT and ZHENG W. Dietary carbohydrates, fiber, and breast cancer risk in Chinese women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, 89:283-289.
- [8645] LEVINE ME, SUAREZ JA, BRANDHORST S, BALASUBRAMANIAN P, CHENG CW, MADIA F, FONTANA L, MIRISOLA MG, GUEVARA-AGUIRRE J, WAN J, PASSARINO G, KENNEDY BK, WEI M, COHEN P, CRIMMINS EM and LONGO VD. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab.*, 2014, 19(3):407-17.
- [8646] WEROHA SJ and HALUSKA P. The insulin-like growth factor system in cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 2012, 41(2):335-50.
- [8647] LAMMING DW, CUMMINGS NE, RASTELLI AL, GAO F, CAVA E, BERTOZZI B, SPELTA F, PILI R and FONTANA L. Restriction of dietary protein decreases mTORC1 in tumors and somatic tissues of a tumor-bearing mouse xenograft model. *Oncotarget*, 2015, 6:31.
- [8648] KERVER JM, GARDINER JC, DORGAN JF, ROSEN CJ and VELIE EM. Dietary predictors of the insulin-like growth factor system in adolescent females: results from the Dietary Intervention Study in Children (DISC). *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, 91(3):643-50.
- [8649] FORMAN MR. Changes in dietary fat and fiber and serum hormone concentrations: nutritional strategies for breast cancer prevention over the life course. *J. Nutr.*, 2007, 137:170S-174S.
- [8651] ORIO F, MUSCOGIURI G, ASCIONE A, MARCIANO F, VOLPE A, LA SALA G, SAVASTANO S, COLAO A and PALOMBA S. Effects of physical exercise on the female reproductive system. *Minerva Endocrinol.*, 2013, 38(3):305-19.
- [8652] BYERS T and SEDJO RL. Body fatness as a cause of cancer: epidemiologic clues to biologic mechanisms. *Endocr. Relat. Cancer*, 2015, 22(3):R125-34.
- [8653] MOUROUTI N, KONTOGIANNI MD, PAPAVALAGELIS C and PANAGIOTAKOS DB. Diet and breast cancer: a systematic review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2015, 66(1):1-42.
- [8654] GARLAND M, SACKS FM, COLDITZ GA, RIMM EB, SAMPSON LA, WILLETT WC and HUNTER DJ. The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67(1):25-30.
- [8655] KAAKS R, TIKK K, SOOKTHAI D *et al.* (41 authors). Premenopausal serum sex hormone levels in relation to breast cancer risk, overall and by hormone receptor status - results from the EPIC cohort. *Int. J. Cancer*, 2014, 134(8):1947-57.
- [8656] PROTANI M, COORY M and MARTIN JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2010, 123(3):627-35.
- [8657] MORAL R, ESCRICH R, SOLANAS M, VELA E, RUIZ DE VILLA MC and ESCRICH E. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. *Eur. J. Nutr.*, 2015.
- [8660] OTLES S and OZGOZ S. Health effects of dietary fiber. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2014., 13(2):191-202.
- [8661] KRISHNAN AV, SWAMI S and FELDMAN D. Equivalent anticancer activities of dietary vitamin D and calcitriol in an animal model of breast cancer: importance of mammary CYP27B1 for treatment and prevention. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2013, 136:289-95.
- [8662] HAMDY SM, LATIF AK, DREES EA and SOLIMAN SM. Prevention of rat breast cancer by genistin and selenium. *Toxicol. Ind. Health*, 2012, 28(8):746-57.
- [8663] DE MIRANDA JX, ANDRADE FDE O, CONTI AD, DAGLI ML, MORENO FS and ONG TP. Effects of selenium compounds on proliferation and epigenetic marks of breast cancer cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014, 28(4): 486-91.
- [8664] KOTSOPOULOS J, SOHN KJ, MARTIN R, CHOI M, RENLUND R, MCKERLIE C, HWANG SW, MEDLINE A and KIM YI. Dietary folate deficiency suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 2003, 24(5):937-44.

- [8665] DEGHAN MANSHADI S, ISHIGURO L, SOHN KJ, MEDLINE A, RENLUND R, CROXFORD R and KIM YI. Folic acid supplementation promotes mammary tumor progression in a rat model. *PLoS One*, 2014, 21;9(1): e84635.
- [8666] LOPRINZI PD, CARDINAL BJ, WINTERS-STONE K, SMIT E and LOPRINZI CL. Physical activity and the risk of breast cancer recurrence: a literature review. *Oncol. Nurs. Forum*, 2012, 1;39(3):269-74.
- [8667] NAROD SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2011, 8(11):669-76.
- [8668] GUO JU, SU Y, SHIN JH, SHIN J, LI H, XIE B, ZHONG C, HU S, LE T, FAN G, ZHU H, CHANG Q, GAO Y, MING GL and SONG H. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.*, 2014, 17(2):215-22.
- [8669] VISSE R and NAGASE H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*, 2003, 92: 827-839.
- [8670] BASAK P, DILLON R, LESLIE H, RAOUF A and MOWAT MR The Deleted in Liver Cancer 1 (Dlc1) tumor suppressor is haploinsufficient for mammary gland development and epithelial cell polarity. *BMC Cancer*, 2015, 15:630.
- [8671] LI M, FU X, MA G, SUN X, DONG X, NAGY T, XING C, LI J and DONG JT. Atbf1 regulates pubertal mammary gland development likely by inhibiting the pro-proliferative function of estrogen-ER signaling. *PLoS One*, 2012; 7(12):e51283.
- [8672] MONTALES MT, MELNYK SB, SIMMEN FA and SIMMEN RC. Maternal metabolic perturbations elicited by high-fat diet promote Wnt-1-induced mammary tumor risk in adult female offspring via long-term effects on mammary and systemic phenotypes. *Carcinogenesis*, 2014, 35(9):2102-12.
- [8673] DAMMANN R, SCHAGDARSURENGIN U, SEIDEL C, STRUNNIKOVA M, RASTETTER M, BAIER K and PFEIFER GP. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol. Histopathol.*, 2005, 20(2):645-63.
- [8674] MYLONA E, MAGKOU C, GIANNOPOULOU I, AGROGIANNIS G, MARKAKI S, KERAMOPOULOS A and NAKOPOULOU L. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in invasive breast carcinoma: relation to tumor phenotype and clinical outcome. *Breast Cancer Res.*, 2006;8(5):R57.
- [8675] CUI H, ZHAO C, GONG P, WANG L, WU H, ZHANG K, ZHOU R, WANG L, ZHANG T, ZHONG S and FAN H. DNA methyltransferase 3A promotes cell proliferation by silencing CDK inhibitor p18(INK4C) in gastric carcinogenesis. *Sci. Rep.*, 2015, 5:13781.
- [8676] DAA T, KASHIMA K, KONDO Y, YADA N, SUZUKI M and YOKOYAMA S. Aberrant methylation in promoter regions of cyclin-dependent kinase inhibitor genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *APMIS*, 2008, 116(1):21-6.
- [8677] SÁNCHEZ-AGUILERA A, DELGADO J, CAMACHO FI, SÁNCHEZ-BEATO M, SÁNCHEZ L, MONTALBÁN C, FRESNO MF, MARTÍN C, PIRIS MA and GARCÍA JF. Silencing of the p18INK4c gene by promoter hypermethylation in Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Blood*, 2004, 103(6):2351-7.
- [8678] KIRSCH M, MÖRZ M, PINZER T, SCHACKERT HK and SCHACKERT G. Frequent loss of the CDKN2C (p18INK4c) gene product in pituitary adenomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(2):143-54.
- [8679] SPIRIN K, SIMPSON J, MILLER C and KOEFFLER H. Molecular analysis of INK4 genes in breast carcinomas. *Int. J. Oncol.*, 1997, 11(4):737-44.
- [8680] SHEARSTONE JR, POP R, BOCK C, BOYLE P, MEISSNER A and SOCOLOVSKY M. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science*, 2011, 334(6057):799-802.
- [8681] GARCIA-LACARTE M, MILAGRO FI, ZULET MA, MARTINEZ JA and MANSEGO ML. LINE-1 methylation levels, a biomarker of weight loss in obese subjects, are influenced by dietary antioxidant capacity. *Redox Rep.*, 2015. [Epub ahead of print].
- [8682] POGRIBNY IP and VANYUSHIN BF. Age-Related Genomic Hypomethylation. *Epigenetics of Aging*, 2009, 11-27.
- [8683] SOARES J, PINTO AE, CUNHA CV, ANDRÉ S, BARÃO I, SOUSA JM and CRAVO M. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer*, 1999, 85(1):112-8.
- [8684] CHO YH, YAZICI H, WU HC, TERRY MB, GONZALEZ K, QU M, DALAY N and SANTELLA RM. Aberrant promoter hypermethylation and genomic hypomethylation in tumor, adjacent normal tissues and blood from breast cancer patients. *Anticancer Res.*, 2010, 30(7):2489-96.
- [8685] PFEIFER GP and DAMMANN R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(5):576-83.
- [8686] PRASAD R, VAID M, SINGH T and KATIYAR SK. High-fat diet stimulates the growth of UV radiation-induced skin tumors by enhancing DNA hypermethylation and silencing of tumor suppressor genes in mouse skin and tumors. *J. Inv. Dermatol.*, 2014, 134:S114-S120.

- [8687] LI Z, GUO X, WU Y, LI S, YAN J, PENG L, XIAO Z, WANG S, DENG Z, DAI L, YI W, XIA K, TANG L and WANG J. Methylation profiling of 48 candidate genes in tumor and matched normal tissues from breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, 149(3):767-79.
- [8688] MIRZA S, SHARMA G, PARSHAD R, GUPTA SD, PANDYA P and RALHAN R. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J. Breast Cancer*, 2013, 16(1):23-31.
- [8689] ZANE L, SHARMA V and MISTELI T. Common features of chromatin in aging and cancer: cause or coincidence? *Trends Cell Biol.*, 2014, 24(11):686-94.
- [8690] DENIS H, NDLOVU MN and FUKS F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.*, 2011, 12(7):647-56.
- [8691] KRIFA M, LELOUP L, GHEDIRA K, MOUSLI M and CHEKIR-GHEDIRA L. Luteolin induces apoptosis in BE colorectal cancer cells by downregulating calpain, UHRF1, and DNMT1 expressions. *Nutr. Cancer*, 2014, 66(7):1220-7.
- [8692] PRIYADARSINI RV, VINOTHINI G, MURUGAN RS, MANIKANDAN P and NAGINI S. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr. Cancer*, 2011, 63(2):218-26.
- [8693] DAVISON JM, MELLOTT TJ, KOVACHEVA VP and BLUSZTAJN JK. Gestational choline supply regulates methylation of histone H3, expression of histone methyltransferases G9a (Kmt1c) and Suv39h1 (Kmt1a), and DNA methylation of their genes in rat fetal liver and brain. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284(4):1982-9.
- [8694] STRAKOVSKY RS, ZHANG X, ZHOU D and PAN YX. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *J. Physiol.*, 2011, 589(11): 2707–2717.
- [8695] POGRIBNY IP, TRYNDYAK VP, MUSKHELISHVILI L, RUSYN I and ROSS SA. Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J. Nutr.*, 2007, 137(1 Suppl):216S-222S.
- [8696] ALVAREZ C, TAPIA T, CORNEJO V, FERNANDEZ W, MUÑOZ A, CAMUS M, ALVAREZ M, DEVOTO L and CARVALLO P. Silencing of tumor suppressor genes RASSF1A, SLIT2, and WIF1 by promoter hypermethylation in hereditary breast cancer. *Mol. Carcinog.*, 2013, 52(6):475-87.
- [8697] CHEN KM, STEPHEN JK, RAJU U and WORSHAM MJ. Delineating an epigenetic continuum for initiation, transformation and progression to breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2011, 3(2):1580-92.
- [8710] KLAJIC J, FLEISCHER T, DEJEUX E, EDVARSDEN H, WARNBERG F, BUKHOLM I, LØNNING PE, SOLVANG H, BØRRESEN-DALE AL, TOST J and KRISTENSEN VN. Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer*, 2013, 13:456.
- [8711] CHO YH, MCCULLOUGH LE, GAMMON MD, WU HC, ZHANG YJ, WANG Q, XU X, TEITELBAUM SL, NEUGUT AI, CHEN J and SANTELLA RM. Promoter Hypermethylation in White Blood Cell DNA and Breast Cancer Risk. *J. Cancer*, 2015, 6(9):819-24.
- [8712] GYÓRFFY B, BOTTAI G, FLEISCHER T, MUNKÁCSY G, BUDCZIES J, PALADINI L, BØRRESEN-DALE AL, KRISTENSEN VN and SANTARPIA L. Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes. *Int. J. Cancer*, 2016, 138(1):87-97.
- [8713] GIL A. Tratado de Nutrición. Nutrición humana en estado de salud. 2a Ed. Panamericana, 2010.
- [8714] SHIM JS, OH K and KIM HC. Dietary assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiol. Health*, 2014, 36: e2014009.
- [8715] HU EA, TOLEDO E, DIEZ-ESPINO J, ESTRUCH R, CORELLA D, SALAS-SALVADO J, VINYOLES E, GOMEZ-GRACIA E, AROS F, FIOL M, LAPETRA J, SERRA-MAJEM L, PINTÓ X, PORTILLO MP, LAMUELA-RAVENTOS RM, ROS E, SORLI JV and MARTINEZ-GONZALEZ MA. Lifestyles and risk factors associated with adherence to the Mediterranean diet: a baseline assessment of the PREDIMED trial. *PLoS One*, 2013, 8(4):e60166.
- [8716] BABIO N, BULLÓ M, BASORA J, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, FERNÁNDEZ-BALLART J, MÁRQUEZ-SANDOVAL F, MOLINA C, SALAS-SALVADÓ J and NURETA-PREDIMED INVESTIGATORS. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2009, 19(8):563-70.
- [8718] THOMAS BS, O'DEA J and FENTIMAN IS. Erythrocyte membrane stearic and oleic acid ratios in breast cancer. *Br. J. Surg.*, 1988, 75:1078–9.
- [8719] CHAJÈS V, HULTÉN K, VAN KAPPEL AL, WINKVIST A, KAAKS R, HALLMANS G, LENNER P and RIBOLI E. Fatty-acid composition in serum phospholipids and risk of breast cancer: an incident case-control study in Sweden. *Int. J. Cancer*, 1999, 83:585–90.

- [8721] SMEDMAN AE, GUSTAFSSON IB, BERGLUND LG and VESSBY BO. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 69(1):22-9.
- [8722] PAGNAN A, CORROCHER R, AMBROSIO GB, FERRARI S, GUARINI P, PICCOLO D, OPPORTUNO A, BASSI A, OLIVIERI O and BAGGIO G. Effects of an olive-oil-rich diet on erythrocyte membrane lipid composition and cation transport systems. *Clin. Sci. (Lond.)*, 1989, 76(1):87-93.
- [8723] CORROCHER R, PAGNAN A, AMBROSIO GB, FERRARI S, OLIVIERI O, GUARINI P, BASSI A, PICCOLO D, GANDINI A and GIRELLI D. Effects induced by olive oil-rich diet on erythrocytes membrane lipids and sodium-potassium transports in postmenopausal hypertensive women. *J. Endocrinol. Invest.*, 1992, 15(5):369-76.
- [8724] SARKKINEN ES, AGREN JJ, AHOLA I, OVASKAINEN ML and UUSITUPA MI. Fatty acid composition of serum cholesterol esters, and erythrocyte and platelet membranes as indicators of long-term adherence to fat-modified diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1994, 59(2):364-70.
- [8725] SUN Q, MA J, CAMPOS H, HANKINSON SE and HU FB. Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007, 86(1):74-81.
- [8726] HARRIS WS, POTTALA JV, LACEY SM, VASAN RS, LARSON MG and ROBINS SJ. Clinical correlates and heritability of erythrocyte eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid content in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2):425-31.
- [8727] ZHANG B, WANG P, CHEN CG, HE QQ, ZHUO SY, CHEN YM and SU YX. Validation of an FFQ to estimate the intake of fatty acids using erythrocyte membrane fatty acids and multiple 3d dietary records. *Public Health Nutr.*, 2010, 13(10):1546-52.
- [8728] WILLETT W. *Nutritional epidemiology*. Nueva York: Oxford University Press, 1990.
- [8729] RISÉ P, ELIGINI S, GHEZZI S, COLLI S and GALLI C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids*, 2007, 76(6):363-9.
- [8730] LI L, CHOI JY, LEE KM, SUNG H, PARK SK, OZE I, PAN KF, YOU WC, CHEN YX, FANG JY, MATSUO K, KIM WH, YUASA Y and KANG D. DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J. Epidemiol.*, 2012, 22(5):384-94.
- [8731] GRANN VR, TROXEL AB, ZOJWALLA NJ, JACOBSON JS, HERSHMAN D and NEUGUT AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer*, 2005, 103(11):2241-51.
- [8732] CHRISTENSEN BC, HOUSEMAN EA, MARSIT CJ, ZHENG S, WRENSCH MR, WIEMELS JL, NELSON HH, KARAGAS MR, PADBURY JF, BUENO R, SUGARBAKER DJ, YEH RF, WIENCKE JK and KELSEY KT. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.*, 2009, 5(8):e1000602.
- [8733] ADALSTEINSSON BT, GUDNASON H, ASPELUND T, HARRIS TB, LAUNER LJ, EIRIKSDOTTIR G, SMITH AV and GUDNASON V. Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. *PLoS One*, 2012, 7(10):e46705.
- [8734] REINIUS LE, ACEVEDO N, JOERINK M, PERSHAGEN G, DAHLÉN SE, GRECO D, SÖDERHÄLL C, SCHEYNIUS A and KERE J. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One*, 2012, 7(7):e41361.
- [8735] LISANTI S, OMAR WA, TOMASZEWSKI B, DE PRINS S, JACOBS G, KOPPEN G, MATHERS JC and LANGIE SA. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One*, 2013, 8(11):e79044.
- [8736] KOESTLER DC, CHRISTENSEN B, KARAGAS MR, MARSIT CJ, LANGEVIN SM, KELSEY KT, WIENCKE JK and HOUSEMAN EA. Blood-based profiles of DNA methylation predict the underlying distribution of cell types: a validation analysis. *Epigenetics*, 2013, 8(8):816-26.
- [8737] WU HC, DELGADO-CRUZATA L, FLOM JD, KAPPIL M, FERRIS JS, LIAO Y, SANTELLA RM and TERRY MB. Global methylation profiles in DNA from different blood cell types. *Epigenetics*, 2011, 6(1):76-85.
- [8738] DELGADO-CRUZATA L, WU HC, LIAO Y, SANTELLA RM and TERRY MB. Differences in DNA methylation by extent of breast cancer family history in unaffected women. *Epigenetics*, 2014, 9(2):243-8.
- [8739] CHOI JY, JAMES SR, LINK PA, MCCANN SE, HONG CC, DAVIS W, NESLINE MK, AMBROSONE CB and KARPf AR. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*, 2009, 30(11):1889-97.
- [8740] VAN HOESSEL AQ, VAN DE VELDE CJ, KUPPEN PJ, LIEFERS GJ, PUTTER H, SATO Y, ELASHOFF DA, TURNER RR, SHAMONKI JM, DE KRUIJF EM, VAN NES JG, GIULIANO AE and HOON DS. Hypomethylation

- of LINE-1 in primary tumor has poor prognosis in young breast cancer patients: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 134(3):1103-14.
- [8741] BABA Y, HUTTENHOWER C, NOSHO K, TANAKA N, SHIMA K, HAZRA A, SCHERNHAMMER ES, HUNTER DJ, GIOVANNUCCI EL, FUCHS CS and OGINO S. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Mol. Cancer*, 2010, 9:125.
- [8742] ROMAN-GOMEZ J, JIMENEZ-VELASCO A, AGIRRE X, CERVANTES F, SANCHEZ J, GARATE L, BARRIOS M, CASTILLEJO JA, NAVARRO G, COLOMER D, PROSPER F, HEINIGER A and TORRES A. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*, 2005, 24(48):7213–7223.
- [8743] SAITO K, KAWAKAMI K, MATSUMOTO I, ODA M, WATANABE G and MINAMOTO T. Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16(8):2418–2426.
- [8744] HOU L, WANG H, SARTORI S, GAWRON A, LISSOWSKA J, BOLLATI V, TARANTINI L, ZHANG FF, ZATONSKI W, CHOW WH and BACCARELLI A. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int. J. Cancer*, 2010, 127(8):1866-74.
- [8745] WILHELM CS, KELSEY KT, BUTLER R, PLAZA S, GAGNE L, ZENS MS, ANDREW AS, MORRIS S, NELSON HH, SCHNED AR, KARAGAS MR and MARSIT CJ. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16(5):1682-9.
- [8746] HSIUNG DT, MARSIT CJ, HOUSEMAN EA, EDDY K, FURNISS CS, MCCLEAN MD and KELSEY KT. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, 16(1):108-14.
- [8747] KITKUMTHORN N and MUTIRANGURA A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin. Epigenetics*, 2011, 2(2):315-30.
- [8748] LIAO LM, BRENNAN P, VAN BEMMEL DM, ZARIDZE D, MATVEEV V, JANOUT V, KOLLAROVA H, BENCKO V, NAVRATILOVA M, SZESZENIA-DABROWSKA N, MATES D, ROTHMAN N, BOFFETTA P, CHOW WH and MOORE LE. LINE-1 methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27361.
- [8749] NEALE RE, CLARK PJ, FAWCETT J, FRITSCHI L, NAGLER BN, RISCH HA, WALTERS RJ, CRAWFORD WJ, WEBB PM, WHITEMAN DC and BUCHANAN DD. Association between hypermethylation of DNA repetitive elements in white blood cell DNA and pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol.*, 2014, 38(5):576-82.
- [8750] DELGADO-CRUZATA L, ZHANG W, MCDONALD JA, TSAI WY, VALDOVINOS C, FALCI L, WANG Q, CREW KD, SANTELLA RM, HERSHMAN DL and GREENLEE H. Dietary modifications, weight loss, and changes in metabolic markers affect global DNA methylation in Hispanic, African American, and Afro-Caribbean breast cancer survivors. *J. Nutr.*, 2015, 145(4):783-90.
- [8751] YIP CH and RHODES A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol.*, 2014, 10(14):2293-301.
- [8752] MIRZA S, SHARMA G, PARSHAD R, SRIVASTAVA A, GUPTA SD and RALHAN R. Clinical significance of promoter hypermethylation of ER β and RAR β 2 in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.*, 2012, 19(9):3107-15.
- [8753] KOVATS S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol.*, 2015, 294(2):63-9.
- [8754] JONES PA and LAIRD PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 1999, 21(2):163-7.
- [8755] KIOULAFI M, KAKLAMANIS L, MAVROUDIS D, GEORGOULIAS V and LIANIDOU ES. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer. *Clin. Biochem.*, 2009, 42(10-11):970-5.
- [8756] KANEKO K, ISHIGAMI S, KIJIMA Y, FUNASAKO Y, HIRATA M, OKUMURA H, SHINCHI H, KORIYAMA C, UENO S, YOSHINAKA H and NATSUGOE S. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer*, 2011, 11:454.
- [8757] ZHANG Y, BHAT I, ZENG M, JAYAL G, WAZER DE, BAND H and BAND V. Human kallikrein 10, a predictive marker for breast cancer. *Biol. Chem.*, 2006, 387(6):715-21.
- [8758] PFEIFER GP, YOON JH, LIU L, TOMMASI S, WILCZYNSKI SP and DAMMANN R. Methylation of the RASSF1A gene in human cancers. *Biol. Chem.*, 2002, 383(6):907-14.
- [8759] GRAWENDA AM and O'NEILL E. Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *Br. J. Cancer*, 2015, 113(3):372-81.
- [8760] MARTÍNEZ-GALÁN J, TORRES B, DEL MORAL R, MUÑOZ-GÁMEZ JA, MARTÍN-OLIVA D, VILLALOBOS M, NÚÑEZ MI, LUNA JDE D, OLIVER FJ and RUIZ DE ALMODÓVAR JM. Quantitative detection of methylated

- ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biol. Ther.*, 2008, 7(6):958-965.
- [8761] KRISTENSEN LS, RAYNOR MP, CANDILORO I and DOBROVIC A. Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes. *Oncotarget*, 2012, 3(4):450-61.
- [8762] PETRAKI CD, KARAVANA VN, LUO LY and DIAMANDIS EP. Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 2002, 50(9):1247-61.
- [8763] DOMANN FE, RICE JC, HENDRIX MJ and FUTSCHER BW. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. *Int. J. Cancer*, 2000, 85(6):805-10.
- [8764] RADPOUR R, BAREKATI Z, KOHLER C, LV Q, BÜRKI N, DIESCH C, BITZER J, ZHENG H, SCHMID S and ZHONG XY. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One*, 2011, 6(1):e16080.
- [8765] VAN DE VOORDE L, SPEECKAERT R, VAN GESTEL D, BRACKE M, DE NEVE W, DELANGHE J and SPEECKAERT M. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer. *Mutat. Res.*, 2012, 751(2):304-25.
- [8766] FRIDRICHOVA I, SMOLKOVA B, KAJABOVA V, ZMETAKOVA I, KRIVULCIK T, MEGO M, CIERNA Z, KARABA M, BENCA J, PINDAK D, BOHAC M, REPISKA V and DANIHEL L. CXCL12 and ADAM23 hypermethylation are associated with advanced breast cancers. *Transl. Res.*, 2015, 165(6):717-30.
- [8767] ZHOU W, JIANG Z, LIU N, XU F, WEN P, LIU Y, ZHONG W, SONG X, CHANG X, ZHANG X, WEI G and YU J. Down-regulation of CXCL12 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with metastatic progression in human breast carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2009, 135(1):91-102.
- [8768] HUI R, MACMILLAN RD, KENNY FS, MUSGROVE EA, BLAMEY RW, NICHOLSON RI, ROBERTSON JF and SUTHERLAND RL. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6:2777-2787.
- [8769] LILISCHKIS R, KNEITZ H, LEHMANN U and KREIPE H. Positive display of methylated sites: a novel method for the detection of promoter methylation. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2000, 9:165-171.
- [8770] BRENNER AJ, PALADUGU A, WANG H, OLOPADE OI, DREYLING MH and ALDAZ CM. Preferential loss of expression of p16(INK4a) rather than p19(ARF) in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1996, 2:1993-1998.
- [8771] NIELSEN NH, ROOS G, EMDIN SO and LANDBERG G. Methylation of the p16(Ink4a) tumor suppressor gene 5'-CpG island in breast cancer. *Cancer Lett.*, 2001, 163(1):59-69.
- [8772] CHIMONIDOU M, TZITZIRA A, STRATI A, SOTIROPOULOU G, SFIKAS C, MALAMOS N, GEORGOULIAS V and LIANIDOU E. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin. Biochem.*, 2013, 46(3):235-40.
- [8773] LACROIX M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer*, 2006, 13(4):1033-67.
- [8774] ZHANG L and LONG X. Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies. *Sci. Rep.*, 2015, 5:17869.
- [8775] WARTON K and SAMIMI G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. *Front. Mol. Biosci.*, 2015, 2:13.
- [8776] ESTELLER M, CORN PG, BAYLIN SB and HERMAN JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 2001, 61(8):3225-9.
- [8777] YANG X, YAN L and DAVIDSON NE. DNA methylation in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001, 8(2):115-27.
- [8778] LI S, RONG M and IACOPETTA B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett.*, 2006, 237(2):272-80.
- [8779] BAILEY CM, KHALKHALI-ELLIS Z, SEFTOR EA and HENDRIX MJ. Biological functions of maspin. *J. Cell Physiol.*, 2006, 209(3):617-24.
- [8780] KHAN A and FU J. Epigenetics of Transcription Factor Twist1 and Cancer. *JSM Clin. Oncol. Res.*, 2014, 2(3): 1021.
- [8781] WENDT MK, COOPER AN and DWINELL MB. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene*, 2008, 27(10):1461-71.
- [8782] VAN ROY F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2014, 14(2):121-34.
- [8783] KOTAKE Y, NAEMURA M, MURASAKI C, INOUE Y and OKAMOTO H. Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene. *Anticancer Res.*, 2015, 35(8):4397-401.


- [8784] MEHDIPOUR P, PIROUZPANAH S and YAM AA. Retinoic Acid Receptor b2 Gene in Breast Cancer. *Eur. J. Clin. Med. Oncol.*, 2012, 4(4):17-34.
- [8785] DOWNS B and WANG SM. Epigenetic changes in BRCA1-mutated familial breast cancer. *Cancer Genet.*, 2015, 208(5):237-40.
- [8786] CIOCCA DR and FANELLI MA. Estrogen receptors and cell proliferation in breast cancer. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1997, 8(8):313-21.
- [8787] HU J, LEI H, FEI X, LIANG S, XU H, QIN D, WANG Y, WU Y and LI B. NES1/KLK10 gene represses proliferation, enhances apoptosis and down-regulates glucose metabolism of PC3 prostate cancer cells. *Sci. Rep.*, 2015, 5:17426.
- [8788] TOLEDO E, BEUNZA JJ, NÚÑEZ-CÓRDOBA JM, BES-RASTROLLO M, BASTERRA-GORTARI FJ and MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA. Metabolic risk factors in a cohort of young adults and their association with a body-mass index between 22 and 25 kg/m². *Med. Clin.*, 2009, 132(17):654-60.
- [8789] HERNANDEZ-HERNANDEZ A, GEA A, RUIZ-CANELA M, TOLEDO E, BEUNZA JJ, BES-RASTROLLO M and MARTINEZ-GONZALEZ MA. Mediterranean Alcohol-Drinking Pattern and the Incidence of Cardiovascular Disease and Cardiovascular Mortality: The SUN Project. *Nutrients*, 2015, 7(11):9116-26.
- [8790] COSTANZO S, DI CASTELNUOVO A, DONATI MB, IACOVIELLO L and DE GAETANO G. Alcohol consumption and mortality in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2010, 55(13):1339-47.
- [8791] BLANCO-ROJO R, ALCALA-DIAZ JF, WOPEREIS S, PEREZ-MARTINEZ P, QUINTANA-NAVARRO GM, MARIN C, ORDOVAS JM, VAN OMMEN B, PEREZ-JIMENEZ F, DELGADO-LISTA J and LOPEZ-MIRANDA J. The insulin resistance phenotype (muscle or liver) interacts with the type of diet to determine changes in disposition index after 2 years of intervention: the CORDIOPREV-DIAB randomised clinical trial. *Diabetologia*, 2015. [Epub ahead of print].
- [8792] SOFI F, ABBATE R, GENSINI GF and CASINI A. Accruing evidence about benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010,92:1189–96.
- [8793] VERBERNE L, BACH-FAIG A, BUCKLAND G and SERRA-MAJEM L. Association between the Mediterranean diet and cancer risk: a review of observational studies. *Nutr. Cancer*, 2010, 62:860–70.
- [8794] KONTOU N, PSALTOPOULOU T, PANAGIOTAKOS D, DIMOPOULOS MA and LINOS A. The mediterranean diet in cancer prevention: a review. *J. Med. Food*, 2011, 14:1065–78.
- [8795] GARCÍA CABRERA S, HERRERA FERNÁNDEZ N, RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ C, NISSENSOHN M, ROMÁN-VIÑAS B and SERRA-MAJEM L. KIDMED Test; prevalence of low adherence to the mediterranean diet in children and young; a systematic review. *Nutr. Hosp.*, 2015, 32(n06):2390-2399.
- [8796] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, GARCÍA-ARELLANO A, TOLEDO E, SALAS-SALVADÓ J, BUIL-COSIALES P, CORELLA D, COVAS MI, SCHRÖDER H, ARÓS F, GÓMEZ-GRACIA E, FIOLE M, RUIZ-GUTIÉRREZ V, LAPETRA J, LAMUELA-RAVENTOS RM, SERRA-MAJEM L, PINTÓ X, MUÑOZ MA, WÄRNBERG J, ROS E, ESTRUCH R and PREDIMED STUDY INVESTIGATORS. A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43134.
- [8797] BETTEGOWDA C, SAUSEN M and LEARY RJ *et al.* (60 authors). Detection of circulating tumor DNA in early- and late- stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.*, 2014, 6(224):224ra24.
- [8798] ESMAEILSABZALI H, BEISCHLAG TV, COX ME, PARAMESWARAN AM and PARK EJ. Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods. *Biotechnol. Adv.*, 2013, 31:1063–84.
- [8799] LI H, ZHENG T, CHEN B, HONG G, ZHANG W, SHI T, LI S, AO L, WANG C and GUO Z. Similar blood-borne DNA methylation alterations in cancer and inflammatory diseases determined by subpopulation shifts in peripheral leukocytes. *Br. J. Cancer*, 2014, 111(3):525-31.
- [8802] TOLLEFSBOL T. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*. Academic Press, 2010.

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.


CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS (FFQ)

ID **008867** PÁGINA **1**

marque así



así no marque



Por favor, marque una única opción para cada alimento.

Para cada alimento, marque el recuadro que indica la frecuencia de consumo **por término medio** durante el **año pasado**. Se trata de tener en cuenta también la variación verano/invierno. Por ejemplo, si toma helados 4 veces/semana sólo durante los 3 meses de verano, el consumo promedio al año es 1/semana

	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
			1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6
I. LACTEOS	1. Leche entera (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	2. Leche semidesnatada (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	3. Leche descremada (1 taza, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	4. Leche condensada (1 cucharada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	5. Nata o crema de leche (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	6. Batidos de leche (1 vaso, 200 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	7. Yogurt entero (1, 125 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	8. Yogurt descremado (1, 125 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	9. Petit suisse (1, 55 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	10. Requesón o cuajada (1/2 taza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	11. Queso en porciones o cremoso (1, porción 25 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	12. Otros quesos: curados, semicurados (Manchego, Bola, Emmental...) (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	13. Queso blanco o fresco (Burgos, cabra...) (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	14. Natillas, flan, puding (1, 130 cc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	15. Helados (1 cucurucho)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un plato o ración de 100-150 gr, excepto cuando se indique otra cantidad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS	16. Huevos de gallina (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	17. Pollo o pavo CON piel (1 ración o pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	18. Pollo o pavo SIN piel (1 ración o pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	19. Carne de ternera o vaca (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	20. Carne de cerdo (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	21. Carne de cordero (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	22. Conejo o liebre (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	23. Hígado (ternera, cerdo, pollo) (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	24. Otras vísceras (sesos, corazón, mollejas) (1 ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	25. Jamón serrano o paletilla (1 loncha, 30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	26. Jamón York, jamón cocido (1 loncha, 30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	27. Carnes procesadas (salchichón, chorizo, morcilla, mortadela, salchichas, butifarra, sobrasada, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	28. Patés, foie-gras (25 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	29. Hamburguesa (una, 50 gr.), albóndigas (3 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	30. Tocino, bacon, panceta (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	31. Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, merluza, pescadilla,... (1 plato, pieza o ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	32. Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón (1 plato, pieza o ración 130 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	33. Pescados salados: bacalao, salazones (1 ración, 60 gr. en seco)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	34. Ostras, almejas, mejillones y similares (6 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	35. Calamares, pulpo, chipirones, jibia (sepia) (1 ración, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	36. Crustáceos: gambas, langostinos, cigalas, etc. (4-5 piezas, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	37. Pescados y mariscos enlatados al natural (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	38. Pescados y mariscos en aceite (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (continuación).

Por favor, marque una única opción para cada alimento.


Un plato o ración de 200 grs, excepto cuando se indique	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1 - 3	A LA SEMANA			AL DÍA				
			1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +	
III. VERDURAS Y HORTALIZAS	39. Acelgas, espinacas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	40. Col, coliflor, brócoles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	41. Lechuga, endivias, escarola (100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	42. Tomate crudo (1, 150 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	43. Zanahoria, calabaza (100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	44. Judías verdes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	45. Berenjenas, calabacines, pepinos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	46. Pimientos (150 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	47. Espárragos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	48. Gazpacho andaluz (1 vaso, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	49. Otras verduras (alcachofa, puerro, cardo, apio)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	50. Cebolla (media unidad, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	51. Ajo (1 diente)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	52. Perejil, tomillo, laurel, orégano, etc. (una pizca)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	53. Patatas fritas comerciales (1 bolsa, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	54. Patatas fritas caseras (1 ración, 150 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
55. Patatas asadas o cocidas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
56. Setas, níscalos, champiñones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	


Una pieza o ración	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1 - 3	A LA SEMANA			AL DÍA				
			1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +	
IV. FRUTAS	57. Naranja (una), pomelo (uno), o mandarinas (dos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	58. Plátano (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	59. Manzana o pera (una)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	60. Fresas/fresones (6 unidades, 1 plato postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	61. Cerezas, picotas, ciruelas (1 plato de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	62. Melocotón, albaricoque, nectarina (una pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	63. Sandía (1 tajada, 200-250 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	64. Melón (1 tajada, 200-250 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	65. Kiwi (1 unidad, 100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	66. Uvas (un racimo, 1 plato postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	67. Aceitunas (10 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	68. Frutas en almíbar o en su jugo (2 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	69. Dátiles, higos secos, uvas-pasas, ciruelas-pasas (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	70. Almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos, piñones (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	71. Nueces (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	72. ¿Cuántos días a la semana toma fruta como postre?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Un plato o ración	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
	NUNCA O CASI NUNCA	AL MES 1 - 3	A LA SEMANA			AL DÍA				
			1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +	
V. LEGUMBRES Y CEREALES	73. Lentejas (1 plato, 150 gr. cocidas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	74. Alubias (pintas, blancas o negras) (1 plato, 150 gr. cocidas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	75. Garbanzos (1 plato, 150 gr. cocidos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	76. Guisantes, habas (1 plato, 150 gr. cocidas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	77. Pan blanco, pan de molde (3 rodajas, 75 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	78. Pan negro o integral (3 rodajas, 75 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	79. Cereales desayuno (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	80. Cereales integrales: muesli, copos avena, all-bran (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	81. Arroz blanco (60 gr. en crudo)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	82. Pasta: fideos, macarrones, espaguetis, otras (60 gr. en crudo)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	83. Pizza (1 ración, 200 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>


Anexo 1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (continuación).

de consumo de alimentos (FFQ)

marque así 

así no marque 

Repita el número de la 1ª hoja y vuelva a marcarlo

3 

Por favor, marque una única opción para cada alimento.

Una cucharada o porción individual. Para freír, untar, mojar en el pan, aliñar o para ensaladas, utiliza en total:

	NUNCA O CASI NUNCA	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO			CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO																					
		AL MES	A LA SEMANA		AL DÍA																					
		1 - 3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6 +																	
VI. ACEITES Y GRASAS	84. Aceite de oliva (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	85. Aceite de oliva virgen (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	86. Aceite de oliva de orujo (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	87. Aceite de maíz (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	88. Aceite de girasol (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	89. Aceite de soja (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	90. Mezcla de los anteriores (una cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	91. Margarina (porción individual, 12 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	92. Mantequilla (porción individual, 12 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	93. Manteca de cerdo (10 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
94. Marca de aceite de oliva que usa habitualmente:	<table border="1"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table> No marque aquí								<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
VII. BOLLERÍA Y PASTELERÍA	95. Galletas tipo María (4-6 unidades, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	96. Galletas integrales o de fibra (4-6 unidades, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	97. Galletas con chocolate (4 unidades, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	98. Repostería y bizcochos hechos en casa (50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	99. Croissant, ensaimada, pastas de té u otra bollería industrial comercial... (uno, 50 gr)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	100. Donuts (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	101. Magdalenas (1-2 unidades)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	102. Pasteles (uno, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	103. Churros, porras y similares (1 ración, 100 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	104. Chocolates y bombones (30 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
VIII. MISCELÁNEA	105. Cacao en polvo-cacaos solubles (1 cucharada de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	106. Turrón (1/8 de barra, 40 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	107. Mantecados, mazapán (90 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	108. Croquetas, empanadillas, precocinados (una ración)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	109. Sopas y cremas de sobre (1 plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	110. Mostaza (una cucharadita de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
	111. Mayonesa comercial (1 cucharada sopera = 20 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
112. Salsa de tomate frito, ketchup (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
113. Picante: tabasco, pimienta, pimentón (una pizca)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
114. Sal (una pizca)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
115. Mermeladas (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
116. Azúcar (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
117. Miel (1 cucharadita)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
118. Snacks distintos de patatas fritas: gusanitos, palomitas, maíz, etc. (1 bolsa, 50 gr.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
119. Otros alimentos de frecuente consumo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
119.1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
119.2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		
119.3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																		

Anexo 2. Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea.

CUESTIONARIO DE ADHESIÓN A LA DIETA MEDITERRÁNEA	
1. ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?	NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/>
2. ¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)?	<4 cucharadas <input type="checkbox"/> ≥4 cucharadas <input type="checkbox"/>
3. ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día? (las guarniciones o acompañamientos = 1/2 ración; 1 ración = 200 g.)	<2 <input type="checkbox"/> ≥2 <input type="checkbox"/> <small>(al menos uno de ellas en ensaladas o crudas)</small>
4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumos naturales) consume al día?	<3 <input type="checkbox"/> ≥3 <input type="checkbox"/>
5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día? (ración: 100 - 150 g.)	<1 <input type="checkbox"/> ≥1 <input type="checkbox"/>
6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día? (porción individual: 12 g.)	<1 <input type="checkbox"/> ≥1 <input type="checkbox"/>
7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter) consume al día?	<1 <input type="checkbox"/> ≥1 <input type="checkbox"/>
8. ¿Bebe usted vino? ¿Cuánto consume a la semana?	<7 <input type="checkbox"/> vasos/semana ≥7 <input type="checkbox"/>
9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana? (1 plato o ración de 150 g.)	<3 <input type="checkbox"/> ≥3 <input type="checkbox"/>
10. ¿Cuántas raciones de pescado - mariscos consume a la semana? (1 plato pieza o ración; 100 - 150 g. de pescado o 4 - 5 piezas o 200 g. de marisco)	<3 <input type="checkbox"/> ≥3 <input type="checkbox"/>
11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana?	<2 <input type="checkbox"/> ≥2 <input type="checkbox"/>
12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana? (ración 30 g.)	<3 <input type="checkbox"/> ≥3 <input type="checkbox"/>
13. ¿Consume usted preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas? (carne de pollo: 1 pieza o ración de 100 - 150 g.)	NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/>
14. ¿Cuántas veces a la semana consume verdura cocinada, pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?	<2 <input type="checkbox"/> ≥2 <input type="checkbox"/>

lez-González, et al. Cohort Profile: design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol* 2011 (PMID: 21172932)

der, et al. Validation of a Short Screener for Assessing Mediterranean Diet Adherence among Older Spanish Men and Women. *J Nutr* 2011.

© 2011 by the authors. Published by Elsevier. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Anexo 3. Cuestionario de frecuencia de práctica de actividades físicas.

CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA

Refleje exclusivamente a lápiz
Borre completamente las marcas erróneas
No escriba sobre el margen derecho

No doble ni arrugue la hoja
Marque correctamente las casillas
Marque una sola casilla por respuesta

Marque así Así no marque

use lápiz

ID	1. Fecha de Nacimiento			2. Peso actual (kg)	3. Talla (altura) actual (cm)	4. Perímetro cintura (cm)	5. Perímetro cadera (cm)
	Día	Mes	Año				
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

6. Cuando hace ejercicio o deporte siguiendo su modo típico de hacerlo, ¿Cuál cree que es su grado de intensidad en el esfuerzo?. Puntúelo de 0 (el mínimo posible) a 10 (el máximo).

Nunca hago deporte 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

7. Habitualmente, ¿cuánto tiempo anda al día?

< 10 minutos 10 - 20 minutos 21 - 29 minutos

1/2 - 1 hora 1 - 2 horas > 2 horas

8. Su paso habitual al andar por la calle es...

Lento Normal, medio Rápido Muy rápido

9. ¿Cuántos pisos sube al día por escaleras en total?

2 ó menos 3 - 4 5 - 9 10 - 14 15 ó más

10. ¿Hace ejercicio?

NO (Si es NO pase a la pregunta 12 en el dorso) Sí

11. ¿Cuánto tiempo por término medio dedicó a las siguientes actividades en el último año? (Por favor rellene la frecuencia media durante la semana y los meses del año que practica la actividad)	FRECUENCIA MEDIA DURANTE LA SEMANA										MESES AL AÑO		
	NUNCA	MINUTOS/SEM			HORAS/SEMANA					MESES AL AÑO			
		1 - 4	5 - 19	20 - 59	1 - 1,5	2 - 3	4 - 6	7 - 10	≥11	<3	3 - 6	> 6	
Andar o pasear fuera de casa (incluye golf)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Correr o hacer jogging despacio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Correr más competitivo y rápido (atletismo, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasear en bicicleta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bicicleta estática	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nadar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tenis, frontón, squash, otros de raqueta o pala	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fútbol, fútbol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros de equipo (baloncesto, balonmano,...)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Baile, danza, aerobio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Excursiones al monte, escalada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gimnasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cuidado del jardín y/o piscina, bricolaje, etc.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Esquí, patinaje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Judo, karate u otras artes marciales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vela	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otras actividades físicas - deporte no mencionadas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Validación: Martínez-González, et al. Validation of the Spanish version of the physical activity questionnaire used in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study. Public Health Nutr 2005;8:920-7.

Anexo 3. Cuestionario de frecuencia de práctica de actividades físicas (continuación).

12. Tiempo por término medio en las siguientes actividades en el último año. Distinga y conteste ENTRE SEMANA Y FIN DE SEMANA

TIEMPO AL DÍA	DÍA TÍPICO DE TRABAJO ENTRE SEMANA									DÍA TÍPICO DE FIN DE SEMANA														
	NUNCA	<30min.	30-59min.	HORAS/DÍA						NUNCA	<30min.	30-59min.	HORAS/DÍA											
Ver televisión-video	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sentado ante pantalla ordenador	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Conduciendo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Estar sentado (en total)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dormir por las noches	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dormir la siesta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tomando el sol (verano)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tomando el sol (invierno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Salir con los amigos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
De pie en el trabajo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tareas domésticas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Actividad en el trabajo más intensa que estar de pie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental.



RESEARCH ARTICLE

The Role of Dietary Extra Virgin Olive Oil and Corn Oil on the Alteration of Epigenetic Patterns in the Rat DMBA-Induced Breast Cancer Model

Cristina Rodríguez-Miguel, Raquel Moral*, Raquel Escrich, Elena Vela, Montserrat Solanas, Eduard Escrich

Grup Multidisciplinari per a l'Estudi del Càncer de Mama, Physiology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

* Raquel.Moral@uab.cat



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Rodríguez-Miguel C, Moral R, Escrich R, Vela E, Solanas M, Escrich E (2015) The Role of Dietary Extra Virgin Olive Oil and Corn Oil on the Alteration of Epigenetic Patterns in the Rat DMBA-Induced Breast Cancer Model. PLoS ONE 10(9): e0138980. doi:10.1371/journal.pone.0138980

Editor: William B. Coleman, University of North Carolina School of Medicine, UNITED STATES

Received: June 30, 2015

Accepted: September 8, 2015

Published: September 24, 2015

Copyright: © 2015 Rodríguez-Miguel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by "Plan Nacional I+D+i 2004-2007 & 2008-2011" (AGL2006-07691/ALI & AGL2011-24778) to EE; "Fundación Patrimonio Comunal Olivarero" (FPCO2008-165.396; FPCO2013-CF611.084) to EE; "Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente" (AAO2008-165.471) to EE; "Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español" (OIP2009-165.646) to EE; and Departament de Salut i d'Agricultura, Alimentació i

Abstract

Disruption of epigenetic patterns is a major change occurring in all types of cancers. Such alterations are characterized by global DNA hypomethylation, gene-promoter hypermethylation and aberrant histone modifications, and may be modified by environment. Nutritional factors, and especially dietary lipids, have a role in the etiology of breast cancer. Thus, we aimed to analyze the influence of different high fat diets on DNA methylation and histone modifications in the rat dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced breast cancer model. Female Sprague-Dawley rats were fed a low-fat, a high corn-oil or a high extra-virgin olive oil (EVOO) diet from weaning or from induction with DMBA. In mammary glands and tumors we analyzed global and gene specific (*RASSF1A*, *TIMP3*) DNA methylation by LUMA and bisulfite pyrosequencing assays, respectively. We also determined gene expression and enzymatic activity of DNA methyltransferases (*DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b*) and evaluated changes in histone modifications (H3K4me2, H3K27me3, H4K20me3 and H4K16ac) by western-blot. Our results showed variations along time in the global DNA methylation of the mammary gland displaying decreases at puberty and with aging. The olive oil-enriched diet, on the one hand, increased the levels of global DNA methylation in mammary gland and tumor, and on the other, changed histone modifications patterns. The corn oil-enriched diet increased DNA methyltransferase activity in both tissues, resulting in an increase in the promoter methylation of the tumor suppressor genes *RASSF1A* and *TIMP3*. These results suggest a differential effect of the high fat diets on epigenetic patterns with a relevant role in the neoplastic transformation, which could be one of the mechanisms of their differential promoter effect, clearly stimulating for the high corn-oil diet and with a weaker influence for the high EVOO diet, on breast cancer progression.

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

Acció Rural de la Generalitat de Catalunya* (GC2010-165.000) to EE. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: DMBA, dimethylbenz[*a*]anthracene; DNMT, DNA methyltransferase; EVOO, extra virgin olive oil; HCO, high corn oil; HOO, high olive oil; LF, low fat; LF-HCO, low fat-high corn oil; LF-HOO, low fat-high olive oil; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

Introduction

Breast cancer is the most frequent malignant neoplasia among women worldwide [1]. In addition to genetic, epigenetic and endocrine factors, the environment, and specifically nutritional factors, plays a key role in its etiology. Epidemiological evidence and research studies in animal models suggest that diet, and mainly dietary lipids, play an important role in breast cancer development [2]. Thus, n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) from vegetable oils, especially linoleic acid (18:2n-6) and saturated fat, mainly from animal origin, have shown a stimulating effect on breast cancer. In contrast, an inhibitory effect has been described for n-3 PUFA, conjugated linoleic acid and γ -linolenic acid. Monounsaturated fatty acids (MUFA), mainly oleic acid (18:1n-9, OA), present in high quantities in olive oil, seems to be protective, although some inconsistent data have been reported ranging from protective to weak stimulating effects on tumor growth [3, 4]. In this sense, abundant results have attributed a protective effect on breast cancer risk to Mediterranean Diet, characterized by the consumption of olive oil as the main source of energy [5]. The specific mechanisms by which EVOO (Extra Virgin Olive Oil) and other dietary lipids may exert their modulatory effects on cancer are not fully understood.

Several nutrients with anticancer potential have shown to influence epigenome by interfering with processes deregulated during carcinogenesis, such as global DNA hypomethylation, tumor suppressor gene promoter hypermethylation and aberrant histone modifications [6]. Global DNA hypomethylation reflects loss of methylation associated with aberrant expression of some genes that could contribute to neoplastic transformation, tumorigenesis, cancer progression and chromosomal instability [7]. On the other hand, methylation-dependent gene silencing is a normal mechanism for regulation of gene expression [8]. In cancer cells, gene promoter hypermethylation represents a mutation-independent mechanism for inactivation of tumor suppressor genes. A significant number of cancer-related genes are subject to methylation-dependent silencing, and many of these genes contribute to the hallmarks of cancer, such as *RASSF1A* (Ras-association domain family 1, isoform A) and *TIMP3* (Tissue inhibitor of metalloproteinase-3) [9]. DNA methylation is catalyzed by the enzyme 5-cytosine DNA methyltransferase (DNMT) commonly classified as maintenance (*DNMT1*) and *de novo* (*DNMT3a* and *DNMT3b*). The levels of DNMT, especially those of *DNMT3a* and *DNMT3b*, are often increased in various cancer tissues and cell lines. This may partially account for the hypermethylation of promoter CpG-rich regions of tumor suppressor genes in a variety of malignancies [10]. In addition to DNA methylation disruption, aberrant histone modifications play a role in the carcinogenesis process. Post-translational modifications of histone determine DNA-histone interaction and transcriptional activity of genome, having a functional cross-talk with DNA methylation. Among the various modifications, acetylation and methylation of histone lysines such as H4K16ac, H4K20me3, H3K27me3 and H3K4me2, have been frequently associated with breast cancer [11–13].

Given the increasingly evidence that dietary factors can influence epigenetic changes, a better knowledge of the interrelationships among dietary lipids, epigenetic modifications and breast cancer is necessary to determine the utility of interventions with nutritional components for breast cancer prevention. Hence, the aim of the present study is to analyze the influence of different high fat diets, rich in corn oil or in EVOO, on DNA methylation and histone modifications in the rat dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer model.

Materials and Methods

Animals and experimental design

All animals received humane care under an institutionally approved experimental animal protocol, following the legislation applicable in this country. The protocol, which included

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

euthanasia by decapitation, was approved by the Ethical Committee of Animal and Human Experimentation of our institution (CEEAH 566/3616). Female Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Lab. (L'Arbresle, France, N = 167) and housed 2–3 per cage in a controlled environment and 12:12h light/dark cycle. The day after arrival (23 days of age), 6 animals were euthanized by decapitation and the remaining rats distributed upon the type of diet and timing of dietary intervention (S1 Fig). Three semi-synthetic diets were designed: a low fat diet (3% corn oil-w/w-), a high corn oil diet (20% corn oil) and a high olive oil diet (3% corn oil + 17% extra virgin olive oil). The composition, preparation and suitability of the experimental diets have been described previously [14–16]. Thus, from weaning onwards, control animals were fed the low fat diet (Group LF, N = 87), while the high fat groups animals were fed the high corn oil diet (Group HCO, N = 37) or the high extra virgin olive oil diet (Group HOO, N = 37) and water ad libitum. At 53 days of age, mammary cancer was induced by oral gavage with one single dose of 5 mg of dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) dissolved in corn oil. To study the promotion of the carcinogenesis, after DMBA treatment 50 rats from the LF group were changed to high fat dietary intervention, thus forming the Group low fat—high corn oil (LF-HCO, N = 25), and the Group low fat—high extra virgin olive oil (LF-HOO, N = 25). Animals were euthanized at day 36 (N = 6 / experimental condition: control, HCO, HOO), 51 (N = 6 / experimental condition: control, HCO, HOO), 100 (N = 6 / group) and 236–256 (median 246 days, end of the assay), (N = 20 / group). Abdominal mammary glands were collected and flash frozen for molecular analyses. At the end of the assay tumors were excised, a portion fixed in 4% formalin for histopathological diagnosis [17], and the rest flash frozen for molecular analyses. Only data from confirmed mammary adenocarcinomas has been included in this study.

DNA isolation and bisulfite modification

Genomic DNA was extracted from mammary glands and tumors using the SpeedTools Tissue DNA Extraction kit (Biotools B&M Labs, Madrid, Spain), according to the manufacturer's recommendations. The concentration of extracted DNAs was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The 260/280 and 260/230 nm ratios were used to evaluate the DNA purity and the integrity was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

The extracted DNAs were treated with sodium bisulfite using the CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification Kit (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), converting all unmethylated cytosine to uracil.

Determination of global DNA methylation level (LUMinometric Methylation Assay-LUMA-)

Global DNA methylation level was determined by LUMA as described previously [18] with modifications [19]. Briefly, genomic DNA was cleaved with *HpaII* + *EcoRI*-HF or *MspI* + *EcoRI*-HF (New England Biolabs) in two parallel reactions containing 500 ng genomic DNA and 5U of each restriction enzyme. The reactions were incubated for 4 hours at 37°C. Samples were analyzed in the Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) from the Universitat Autònoma de Barcelona, using the PyroMark Q96 ID System (Qiagen), with the following dispensation order: GTGTCACATGTGTG. Percentage of DNA methylation was expressed as $[1 - (HpaII+EcoRI \Sigma G/\Sigma T)/(MspI+EcoRI \Sigma G/\Sigma T)] * 100$. This percentage represents the amount of 5-mC within the CCGG motif throughout the genome.

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

RNA isolation and gene expression analysis by Real-Time PCR

Total RNA from mammary glands and tumors were extracted using the Tissue RNeasy Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was quantified spectrophotometrically with NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and integrity was assessed by 2% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The study of expression of specific genes was performed by real-time PCR using the TaqMan methodology (Applied Biosystems), in the iCycler MyiQ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Reactions were prepared with the TaqMan Universal PCR Master Mix and the suitable TaqMan assay: Rn01445298_m1 (*RASSF1A*), Rn00441826_m1 (*TIMP3*), Rn00709664_m1 (*DNMT1*), Rn01469994_g1 (*DNMT3A*) and Rn01536419_m1 (*DNMT3B*). Twenty nanograms of cDNA were amplified during 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C. Gene expression was normalized using *HPRT1* (Rn01527840_m1) as a control transcript.

Quantitative methylation analysis (pyrosequencing)

Bisulfite pyrosequencing was used to determine the promoter methylation of *RASSF1A* and *TIMP3* genes in bisulfite-modified DNAs, from mammary glands and tumors. Predesigned methylation assays were used to determine the methylation status of three and six CpG sites in the *RASSF1A* (PM00416297) and *TIMP3* (PM00574896) promoter respectively (PyroMark CpG assay, Qiagen). Briefly, 1 µl of bisulfite-modified DNA (25 ng) was amplified using 1U Platinum[®] Taq High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) in a 25 µl final volume. The amplification conditions were: denaturing at 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 30 seconds, at 55°C for 30 seconds, at 72°C for 45 seconds and a final extension at 72°C for 5 minutes. Simple robust amplification was confirmed by visualization in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Pyrosequencing reactions were then analyzed in the Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) from the Universitat Autònoma de Barcelona, using in the PSQ HS 96 Pyrosequencing Instrument. Methylation data were presented as the percentage of average methylation in all observed CpG sites.

DNMT activity

Global DNA methyltransferase (DNMT) activity was evaluated in nuclear protein extracts from mammary glands and tumors obtained using the EpiQuik Nuclear Extraction Kit (Epi-tek, Farmingdale, NY, USA). DNA methyltransferase activity was measured in duplicates using the EpiQuik[™] DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra Kit (Epi-tek), following manufacturer's recommendations. Replicates of each sample (include blank and positive control) were analyzed to validate the signal generated. The DNMT activity data were presented as OD/h/mg.

Histone modifications

Modifications of histone 4 (H4K20me3, H4K16ac) and histone 3 (H3K4me2, H3K27me3) were determined in nuclear protein extracts from mammary glands and tumors. Samples were resolved by SDS-PAGE in Any kD[™] Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free[™] Gels (Bio-Rad Laboratories) for 30 minutes at 200 volts, and transferred to PVDF membranes with Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Primary antibodies used were Anti-Histone H4 (tri methyl K20) (1:5000), Anti-Histone H4 (acetyl K16) (1:5000), Anti-Histone H4

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

(1:5000), Anti-Histone H3 (di methyl K4) (1:1000), Anti-Histone H3 (1:10000) from Abcam (Cambridge, UK) and Anti-Histone H3 (tri methyl K27) (1:1000) from Epigentek (Farmingdale, NY, USA). Horseradish peroxidase conjugated rabbit secondary antibody was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Immunoreactive proteins were visualized using the Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore). Densitometric values of bands were analyzed and normalized to the protein loaded on each sample using the Chemi-Doc XRS+ system and the Image Lab™ software (Bio-Rad Laboratories). Values were related to an internal control pool loaded in duplicate in each gel, and normalized to global histone 3 or histone 4.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (20.0 Version) and R/Deducer software (3.1.2 Version). The distribution of each variable was determined by the Kolmogorov-Smirnov test and the equality of variances among groups was determined by Leven's test. Quantitative data were analyzed by the nonparametric Mann-Whitney's U-test. The level of significance was established at $P < 0.05$.

Results

Effects of high fat diets and breast cancer on global DNA methylation

Results of global DNA methylation in mammary gland displayed variations along time, showing clear decreases at puberty (from 23 to 36 days) and in adulthood (from 100 to 246 days) (Fig 1b). In relation to the effect of diets, the group fed with the olive oil one (HOO) showed the highest methylation levels at all ages, close to significance compared to HCO at 36 days and compared to LF at 51 days of age (Fig 1b). In mammary tumors, both groups fed the olive oil-enriched diet had higher values of global DNA methylation (significantly in HOO and close to significance in LF-HOO) compared to LF group (Fig 1c). Finally, we compared the global DNA methylation between mammary gland and tumor in each experimental group at 246 days of age, finding no clear differences among tissues, except an increase in tumor compared to mammary gland in both groups fed the olive oil-enriched diet (significantly in LF-HOO and close to significance in HOO) (Fig 1d).

Effects of high fat diets and breast cancer on RASSF1A and TIMP3 mRNA relative levels

Results for *RASSF1A* and *TIMP3* gene expression in mammary gland showed a great variability along time, displaying different trends in adolescence (36 and 51 days) and in adulthood (100 and 246 days of age). The *RASSF1A* gene expression showed a maximum at 100 days in all groups (except HCO) and a decrease thereafter (Fig 2a). The *TIMP3* gene expression decreased along time in all high fat groups, while reached its maximum at 100 days of age in LF group (Fig 2b). The high fat diets did not modify *RASSF1A* expression at the ages tested. *TIMP3* expression decreased in LF-HCO group compared to LF group at the end of the assay (246 days) (Fig 2b). In tumors, *RASSF1A* gene expression showed a significant decrease in both high olive oil groups in relation to LF and high corn oil groups (Fig 2c), while *TIMP3* expression was lower in LF-HOO group compared with the LF control (Fig 2d). Comparison between tissues showed a significant decrease in the expression of both genes in tumors in all experimental groups (Fig 2e and 2f).

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

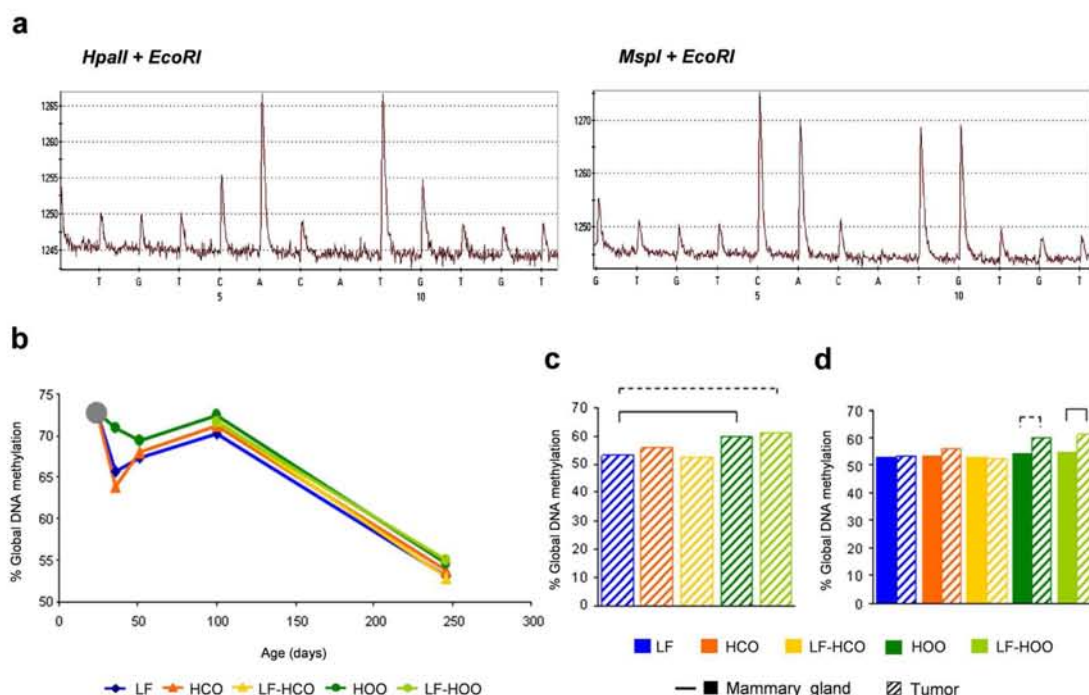


Fig 1. Global DNA methylation level in mammary gland and tumor. (a) Representative pyrograms obtained in LUMA assay of DNA cleaved with *HpaII*+*EcoRI*-HF and *MspI*+*EcoRI*-HF. (b) Determination of global DNA methylation in mammary gland from all experimental groups along time. (c) Global DNA methylation in tumors from all experimental groups at the end of the assay (246 days). (d) Comparison of global DNA methylation between mammary gland and tumors in each experimental group at 246 days of age. Data shown represent medians of the groups. Full lines connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$); dotted lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$).

doi:10.1371/journal.pone.0138980.g001

Effects of high fat diets and breast cancer on DNA promoter methylation of RASSF1A and TIMP3 genes

The promoter methylation of *RASSF1A* (Fig 3a) and *TIMP3* (Fig 3b) genes were determined in bisulfite-modified DNAs from mammary glands and tumors at 246 days. In mammary gland, both groups fed the corn oil-enriched diet had significant increased values of *RASSF1A* methylation compared to LF group. Values from HCO were also significantly higher than those from HOO (Fig 3c). *TIMP3* methylation was also increased in HCO group compared to LF and high extra virgin olive oil groups (Fig 3d). In tumors, the methylation levels of *RASSF1A* increased in all high fat diet groups except in LF-HCO (Fig 3e). *TIMP3* promoter methylation tended to increase in HCO group versus the control, whilst the LF-HOO group had significantly lower levels compared with all other high fat groups (Fig 3f). Finally, comparison between tissues showed an increase in both *RASSF1A* and *TIMP3* promoter methylation in tumors, compared to mammary glands, in all the experimental groups. (Fig 3g and 3h).

Effects of high fat diets and breast cancer on DNMT1, DNMT3a and DNMT3b mRNA relative levels

The mRNA relative levels of the maintenance DNA methyltransferase (*DNMT1*) and the *de novo* methyltransferases (*DNMT3a* and *DNMT3b*) were analyzed by real time PCR in

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

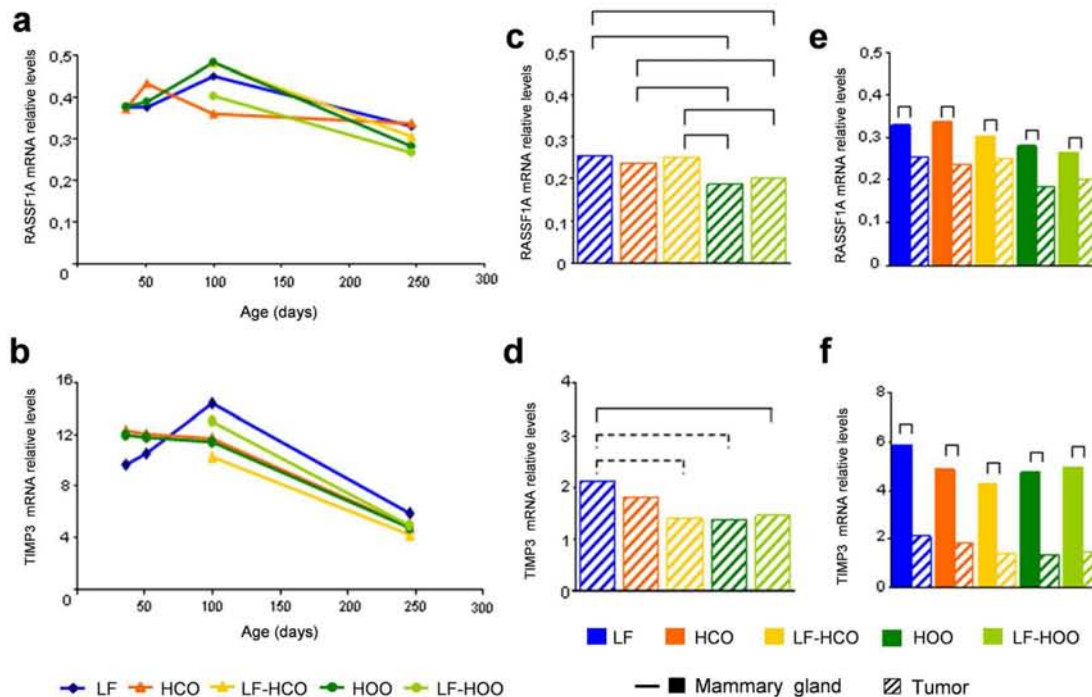


Fig 2. RASSF1A and TIMP3 gene expression in mammary gland and tumor. Determination of RASSF1A (a) and TIMP3 (b) mRNA relative levels in mammary gland from all experimental groups along time. Determination of RASSF1A (c) and TIMP3 (d) mRNA relative levels in tumors from all experimental groups at 246 days of age. Comparison of RASSF1A (e) and TIMP3 (f) mRNA relative levels between both tissues in each experimental group at 246 days of age. Data shown represent medians of the groups. Full lines connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$); dotted lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$).

doi:10.1371/journal.pone.0138980.g002

mammary gland and in tumors at the end of the assay. The *DNMT1* mRNA relative levels were always higher compared to *DNMT3a* and *DNMT3b* mRNA levels in both tissues and in all experimental groups (Fig 4). Expression levels of DNMT in mammary gland at 246 days of age showed a significant increase in *DNMT1* mRNA levels in HCO (Fig 4a) and a decrease in *DNMT3b* mRNA in HOO compared to LF and HCO groups (Fig 4c). In tumors, we did not find significant differences in *DNMT1* and *DNMT3a* mRNA relative levels among groups, although a trend to lower *DNMT3a* levels in EVOO groups was observed (Fig 4d and 4e). *DNMT3b* expression was decreased in HCO and in both high olive oil groups in comparison to the control (Fig 4f). We also compared values from mammary gland and tumor in each experimental group finding, in general, a decrease of DNMT expression in tumor, mainly in *DNMT3a* and *DNMT3b* (Fig 4 g–4i).

Effects of high fat diets and breast cancer on DNMT activity

We determined the total (*de novo* and maintenance) DNA methyltransferase activity at the end of the assay (246 days of age) in mammary gland and tumor. In both tissues, HCO group showed an increase in DNMT activity compared with all other groups. In addition, HOO group showed an increase in DNMT activity compared to LF-HOO group in both tissues and compared to low fat group in mammary gland (Fig 5a and 5b). Comparison between

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

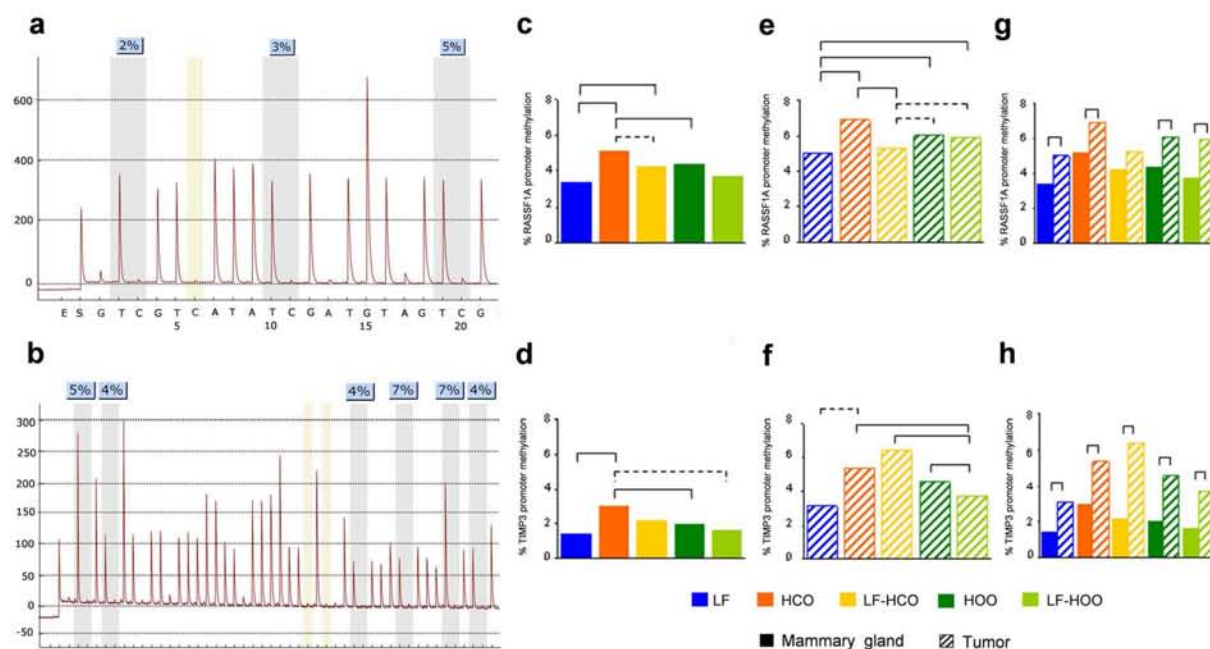


Fig 3. DNA promoter methylation of *RASSF1A* and *TIMP3* genes in mammary gland and tumor. Representative pyrogram of *RASSF1A* (a) and *TIMP3* (b) promoter methylation analyses. Determination of *RASSF1A* and *TIMP3* DNA methylation in mammary gland (c, d) and tumor (e, f) from all experimental groups at 246 days of age. Comparison of *RASSF1A* (g) and *TIMP3* (h) gene methylation between both tissues in each experimental group at 246 days of age. Data shown represent medians of the groups. Full lines connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$); dotted lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$).

doi:10.1371/journal.pone.0138980.g003

mammary gland and tumor in each experimental group showed a statistical significant increase in the tumor DNMT activity in all groups except in HCO (Fig 5c).

Effects of high fat diets and breast cancer on histone modifications

Global levels of histone 3 (H3K4me2, H3K27me3) and histone 4 (H4K20me3, H4K16ac) modifications have been determined in mammary gland and tumor at 246 days of age by western blotting (Fig 6a). In mammary gland, we found no clear differences of such histone modifications among experimental groups, except a significant decrease of H3K27me3 relative levels in HCO group compared to LF group, and a trend to decrease the H4K16ac relative levels in HOO group (Fig 6b). In tumors, the high fat diets did not significantly influence the relative levels of histone 3 modifications (H3K4me2, H3K27me3). Results of histone 4 modifications showed a decrease of H4K20me3 relative levels in LF-HOO group compared with all other groups, and a decrease of H4K16ac in LF-HOO compared to HOO group (Fig 6c). We also compared the global levels of histone 3 and histone 4 modifications between mammary gland and tumor in each experimental group at 246 days of age finding, in general, a decrease of such modifications in tumor (Fig 6d).

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

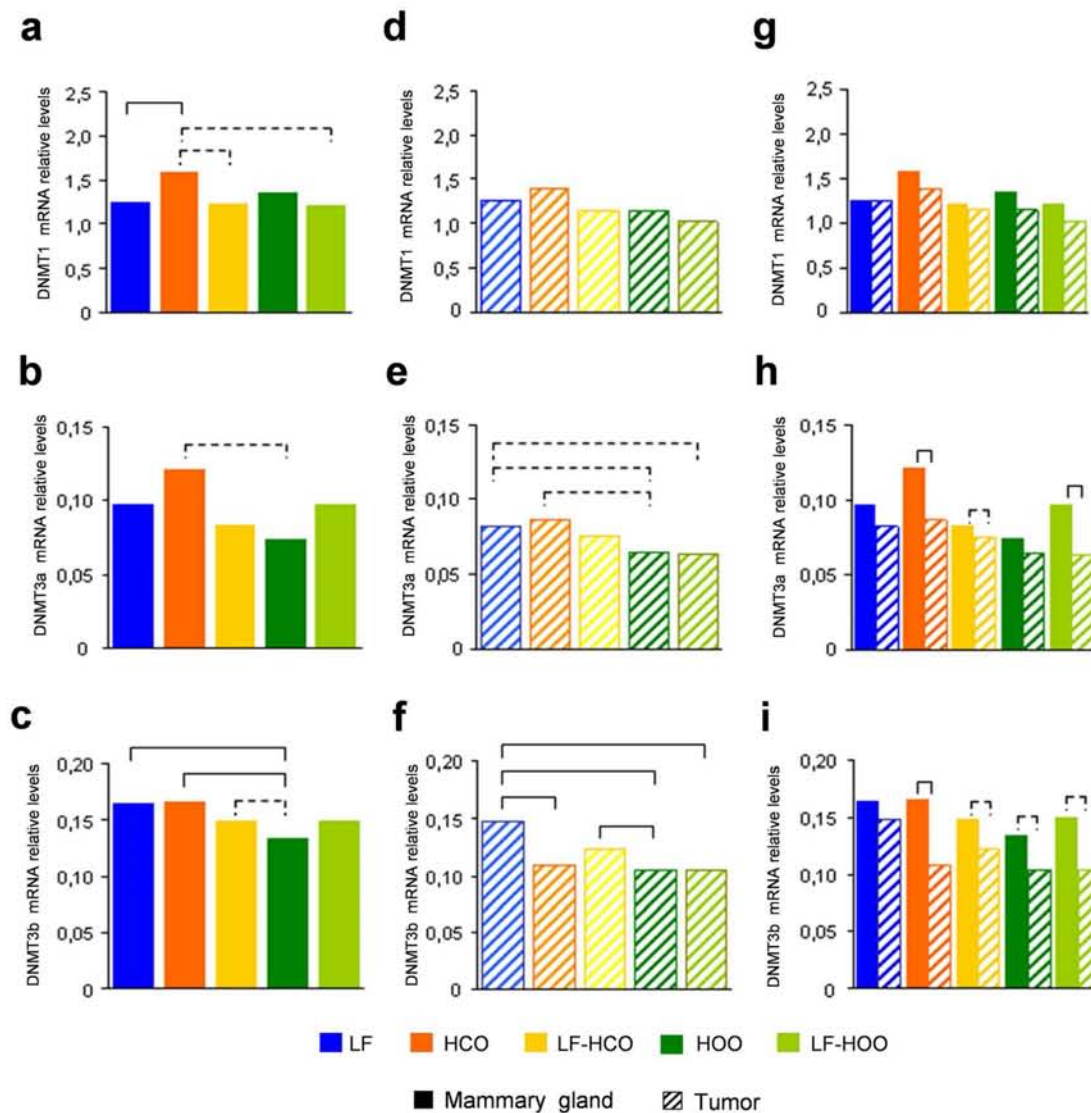


Fig 4. DNA methyltransferase gene expression in mammary gland and tumor. Determination of *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* mRNA relative levels in mammary gland (a, b and c) and tumors (d, e and f) from all experimental groups at 246 days of age. Comparison of *DNMT1* (g), *DNMT3a* (h) and *DNMT3b* (i) mRNA relative levels between both tissues in each experimental group at 246 days of age. Data shown represent medians of the groups. Full lines connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$); dotted lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$).

doi:10.1371/journal.pone.0138980.g004

Discussion

Disruptions of epigenetic patterns including global DNA hypomethylation, tumor suppressor gene promoter hypermethylation and aberrant histone modifications have been considered hallmarks of cancer [20]. These epigenetic changes are reversible and may be modified by nutritional factors, including dietary lipids. In the present study, we have investigated the effect of diets rich in corn oil or in extra virgin olive oil on DNA methylation and histone

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

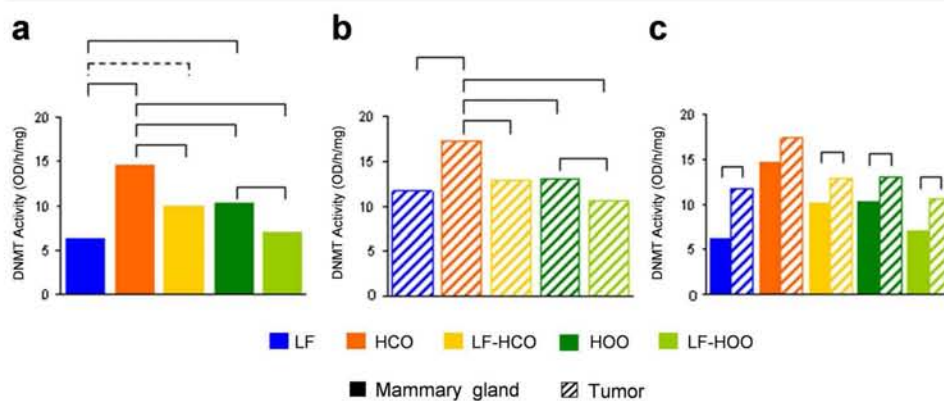


Fig 5. DNA methyltransferase activity in mammary gland and tumor. Determination of DNMT activity in mammary gland (a) and tumors (b) from all experimental groups and comparison between both tissues (c). Data shown represent medians of the groups. Full lines connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$); dotted lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$).

doi:10.1371/journal.pone.0138980.g005

modifications in the rat DMBA-induced breast cancer model. Our results revealed different mechanisms of action of such diets on epigenetic patterns, which could play an important role in the strong enhancing effect described for the high corn oil diet and the weaker effect of the EVOO diet on breast cancer progression.

Previous results in the same animals that have been used in this work, showed a strong tumor enhancing effect of the high corn oil diet when administered from weaning (Group HCO) and from induction (Group LF-HCO), while a weak effect of the high olive oil diet administered in the same periods [21, 22]. Thus, by 246 days of age the high corn oil diet induced a significantly higher percentage of tumor-bearing animals (incidence: LF 80% -16/20-, HCO 100% -20/20-, LF-HCO 100% -20/20-, HOO 75% -15/20-, LF-HOO 85% -17/20-) and tumor yield (number of tumors: LF 46, HCO 99, LF-HCO 87, HOO 58, LF-HOO 83). Moreover, tumors from groups fed such diet tended to appear earlier and had higher volume, and displayed morphological characteristics of higher malignancy. Hence, in this work we aimed to get insight into the molecular mechanisms by which these high fat diets had their differential effects on experimental mammary carcinogenesis.

Global DNA hypomethylation has been associated with neoplastic transformation, tumorigenesis, cancer progression and chromosomal instability [7]. To study the effect of high fat diets on genomic methylation, we have determined the global DNA methylation level of mammary gland and tumor in rats fed diets rich in corn oil or in EVOO. We first observed variations along time in the genomic DNA methylation of the mammary gland, displaying decreases at puberty (from 23 to 36 days) that may be related to the mammary gland development [23, 24]. We have also found an age-related decrease of methylation in adulthood (from 100 to 246 days). Although no data have been reported in this model, such result is in accordance with published evidence in human tissues, which demonstrate that physiologic aging is also accompanied by widespread epigenetic changes, including gradual loss of global DNA methylation [25]. In relation to the effect of diet, our data also showed higher levels of methylation in EVOO groups, both in mammary gland at all ages and in tumor, suggesting an inhibitory effect of EVOO on cancer-related global DNA hypomethylation. This result can be related to previous experimental series where we have observed from a weak protective effect of the high EVOO diet [16] to a weak enhancing effect after chronic intake [21, 22]. Finally, we have

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

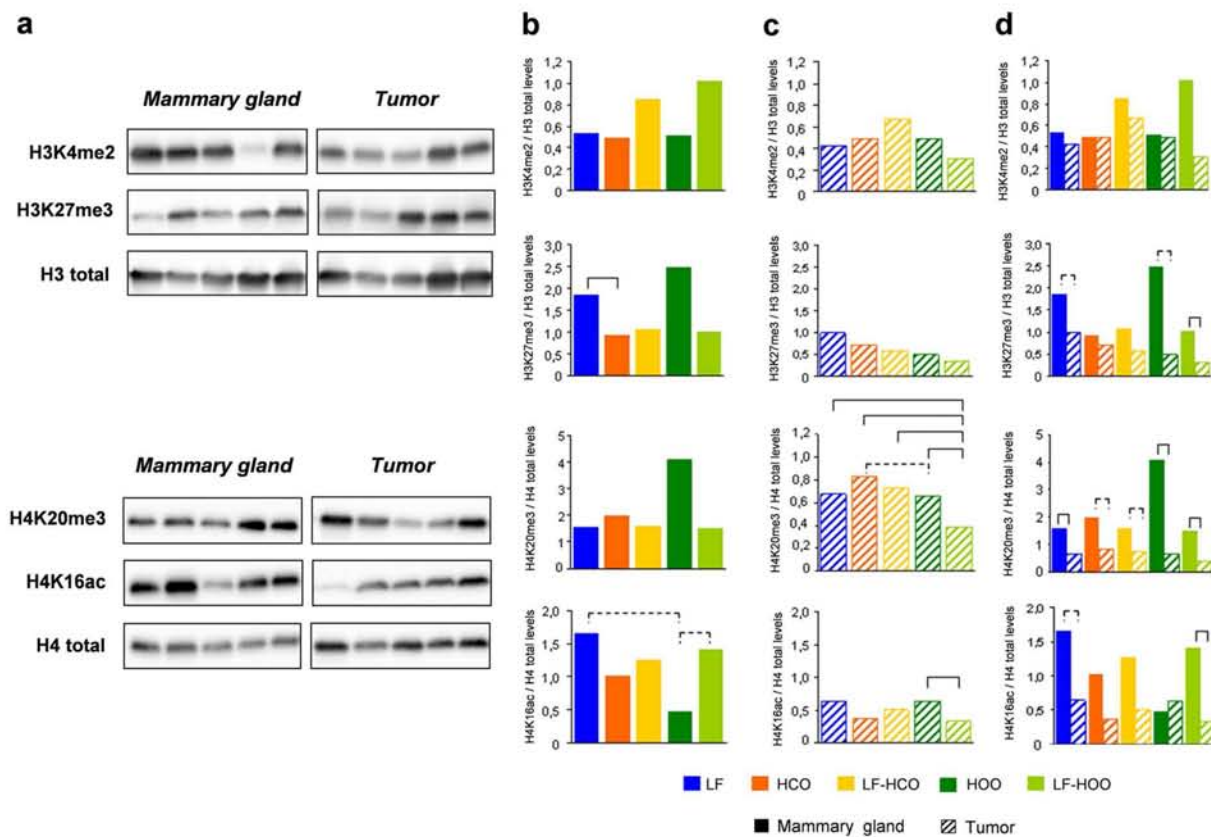


Fig 6. Global levels of histone 3 (H3K4me2, H3K27me3) and histone 4 (H4K20me3, H4K16ac) modifications in mammary gland and tumor. Representative images obtained from western blot data from mammary gland and tumor of histone 3 and histone 4 modifications (a). Determination of relative levels of such modifications in mammary gland (b) and tumor (c) from all experimental groups at 246 days of age. Comparison of global levels of histone modifications between both tissues (d) in each experimental group. Data shown represent medians of the groups. Full lines connecting groups indicate differences statistically significant ($p < 0.05$); dotted lines indicate differences close to significance ($p < 0.1$).

doi:10.1371/journal.pone.0138980.g006

also compared the levels of genomic methylation among mammary gland and tumor in each experimental group at 246 days of age. Contrary to our expectations [20], levels in tumor were not lower than in mammary gland. This could be related to the fact that this gland has suffered a carcinogenic insult. Although no data has been found in DMBA-induced mammary gland, in ACI rats exposure to estrogen and ionizing irradiation decrease global DNA methylation of this tissue [26, 27].

It is well-known that global DNA hypomethylation and tumor suppressor hypermethylation promote carcinogenesis, affecting DNA stability and gene expression [20, 28]. To further investigate the effects of diets, we have analyzed the expression of the tumor suppressor genes *RASSF1A* and *TIMP3*, which have important roles on the key hallmarks that a neoplastic cell acquires, and are frequently down-regulated in breast cancer [29, 30]. We have determined the mRNA relative levels of both genes in mammary gland at all ages and in tumor. We have observed changes in mammary gland along lifetime, with *RASSF1A* and *TIMP3* mRNA levels increasing during the adolescence (36 and 51 days). This regulation may be related to the

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

proliferation and differentiation associated with the mammary gland development, and is in concordance with the reported increase in tumor suppressor expression at the end of puberty in such gland [31]. We also found a decrease in the *RASSF1A* and *TIMP3* gene expression in the adulthood along time (100 and 246 days of age), in accordance with promoter methylation and transcriptional silencing of tumor suppressor genes with aging [32]. In relation to the effects of the high fat diets, little influence was observed in mammary gland, whilst in tumor the EVOO groups showed lower levels of *RASSF1A* and *TIMP3* mRNA. As expected, comparison between tissues indicated a down-regulation in tumor versus mammary gland in all experimental groups, suggesting an inactivation of these tumor suppressor genes in cancer [33].

Hypermethylation of CpG islands in the promoter regions of tumor suppressor genes is one of the main mechanisms for gene silencing [34]. Thus, we have analyzed the promoter methylation of *RASSF1A* and *TIMP3* genes in mammary gland and tumor at 246 days of age, finding a significant increase in both tissues in the corn oil-enriched diet groups, especially in HCO. On the other hand, the EVOO diet, despite being also high fat, only increased *RASSF1A* promoter methylation in the tumor, suggesting a selective mechanism of action on promoter methylation of such diet. In this sense, hydroxytyrosol and oleuropein, the most representative polyphenols in extra virgin olive oil, are able to selectively regulate Type 1 cannabinoid receptor (CB1) expression, a tumor suppressor gene, in Caco-2 cells and in the rat colon via epigenetic mechanisms [35]. In our study, the comparison between tissues showed an increase of *RASSF1A* and *TIMP3* methylation in tumor in all experimental groups. It is in concordance with the hypermethylation of tumor suppressor genes described in cancer [29, 30].

DNA methylation is catalyzed by the enzyme 5-cytosine DNA methyltransferase (DNMT). There are three main DNMT enzymes that possess catalytic methyltransferase activity: *DNMT1* (maintenance methyltransferase), *DNMT3a* and *DNMT3b* (*de novo* methyltransferases). Hence, we investigated the effects of the high fat diets on DNMT function, determining mRNA levels of *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b*, as well as DNMT activity in mammary gland and tumor at 246 days of age. We found higher *DNMT1* mRNA levels compared to *de novo* DNMT in both tissues and in all experimental groups, according to the literature [10], and a coordinated expression of *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* in mammary gland and tumor, as it has been described in several tissues [36]. In relation to the effect of dietary lipids, in mammary gland we observed an increase in *DNMT1* expression in HCO and a decrease in *DNMT3b* expression in HOO group. In tumor, *DNMT3b* mRNA was decreased in all high fat groups. Surprisingly, a decrease of DNMT expression in tumor, compared to mammary gland was, also detected, mainly in *DNMT3a* and *DNMT3b*. Thus, we analyzed DNMT activity finding that, as expected [37], it was increased in tumors versus mammary gland. This imbalance between mRNA levels and DNMT activity indicates that DNMT function is relevantly regulated on the post-transcriptional level. Furthermore, when we analyzed the DNMT activity in relation to the diet administered, an increase in HCO group was found in both tissues (mammary gland and tumor). A consequence of this increase in HCO group could be the higher values of DNA promoter methylation of *RASSF1A* and *TIMP3* genes detected in both tissues [38, 39], which could be one of the mechanisms of the stimulating effect of carcinogenesis of such diet [3, 4, 16, 24, 40, 41]. On the other hand, the olive oil-enriched diets showed intermediate values between the obtained in the low fat group and the corn oil-enriched diet groups, maybe due to the action of polyphenols of EVOO which have shown DNMT inhibition properties [42–44]. Finally, in both tissues there was an increase in DNMT activity in HCO and HOO groups compared with their counterparts LF-HCO and LF-HOO, suggesting that time and duration of high fat diet implementation could have an effect on DNMT activity in such tissues, promoting the carcinogenesis process.

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

DNA methylation and histone modifications interact with each other in the regulation of gene expression [20]. Therefore, we analyzed the effects of the high fat diets on global levels of histone 3 (H3K4me2, H3K27me3) and histone 4 (H4K20me3, H4K16ac) modifications, in mammary gland and tumor at 246 days of age. As far as we know, no data has been published in rat DMBA-induced breast cancer model about dietary effects on these histone modifications. Results showed a decrease in mammary gland of H3K27me3 relative levels in HCO group, and a decrease in tumor of H4K20me3 relative levels in LF-HOO group compared with all other groups. These results could be considered a mechanism by which these lipids influence rat carcinogenesis [3, 4]. Finally, we also compared the global levels of histone 3 and histone 4 modifications between mammary gland and tumor, finding, in general, higher levels of such modifications in mammary gland tissue, according to published data [11–13].

In conclusion, the corn oil-enriched diet increased DNMT activity both in mammary gland and tumor, more likely as a consequence of the stimulation of activity than of the increase in mRNA levels. This effect was reflected in the promoter methylation of *RASSF1A* and *TIMP3* genes in both tissues. However, methylation changes of these genes did not reflect the variations observed in the mRNA levels, indicating the relevant role of other mechanisms regulating their transcriptional silencing. In any case, increases in DNMT activity are related to gene-specific methylation, suggesting that the corn oil-enriched diet may induce hypermethylation of several genes, whose silencing would have a role on the carcinogenesis-promoting effect of this diet [9]. *RASSF1A* and *TIMP3* are tumor suppressor genes that could be inactivated through epigenetic mechanisms in early-events of the carcinogenesis process and, therefore, in the long-term their expression may not reflect the degree of malignancy of tumors. Respect the olive oil-enriched diet, on the one hand, decreased the levels of global DNA hypomethylation and, on the other, changed histone modification patterns. We have previously demonstrated a strong enhancing effect of high corn oil diet on mammary carcinogenesis, while the EVOO diet, despite being high fat, had a weaker effect. Considering the unspecific promoter influence that all high fat diets have on experimental carcinogenesis [45], the EVOO must have some beneficial effects that may partially counteract the total fat intake. Its richness in MUFA and other bioactive components such as phenolic compounds, squalene could be the responsible of the weak protective effect detected in our study. Altogether, our results suggest different effects of the high fat diets, rich in corn oil or in olive oil, on epigenetic mechanisms with a relevant role in the neoplastic transformation. This specific influence could be at the basis, at least in part, of the differential promoter effects described by PUFA n-6 enriched oils and EVOO on breast cancer progression.

Supporting Information

S1 Fig. Experimental design.

(TIF)

S1 File. Detailed data for each variable.

(XLS)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM EE. Performed the experiments: CRM RM RE EV MS EE. Analyzed the data: CRM RM EE. Wrote the paper: CRM RM EE.

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12):2893–2917. doi: [10.1002/ijc.25516](https://doi.org/10.1002/ijc.25516) PMID: [21351269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21351269/)
2. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research; Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A global perspective. Washington DC, American Institute for Cancer Research 2007.
3. Escrich E, Solanas M, Moral R. Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. In: Olive Oil and Health. Edited by Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Yaquob P. Oxford, CABI Publishing 2006, 317–374.
4. Escrich E, Solanas M, Moral R. Olive Oil And Other Dietary Lipids In Breast Cancer. In: Advances in Nutrition and Cancer. Edited by Zappia V, Panico S, Russo GL, Budillon A, Della Regione F. Berlin, Springer-Verlag 2014, 289–309.
5. Schwingshackl L, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer*. 2014; 135(8):1884–1897. doi: [10.1002/ijc.28824](https://doi.org/10.1002/ijc.28824) PMID: [24599882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24599882/)
6. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics*. 2011; 3(4):503–518. doi: [10.2217/epi.11.71](https://doi.org/10.2217/epi.11.71) PMID: [22022340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22022340/)
7. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003; 300(5618):455. PMID: [12702868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12702868/)
8. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003; 22(42):6479–6483. PMID: [14528271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14528271/)
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646–674. doi: [10.1016/j.cell.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013) PMID: [21376230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/)
10. Kanai Y, Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis*. 2007; 28(12):2434–2442. PMID: [17893234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17893234/)
11. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*. 2005; 37(4):391–400. PMID: [15765097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15765097/)
12. Wei Y, Xia W, Zhang Z, Liu J, Wang H, Adsay NV, et al. Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Mol Carcinog*. 2008; 47(9):701–706. doi: [10.1002/mc.20413](https://doi.org/10.1002/mc.20413) PMID: [18176935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18176935/)
13. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012; 13(5):343–357. doi: [10.1038/nrg3173](https://doi.org/10.1038/nrg3173) PMID: [22473383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22473383/)
14. Solanas M, Hurtado A, Costa I, Moral R, Menéndez JA, Colomer R, et al. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol*. 2002; 21(4):745–753. PMID: [12239612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12239612/)
15. Escrich E, Solanas M, Segura R. Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: I—Diet definition. *In Vivo*. 1994; 8(6):1099–1105. PMID: [7772745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7772745/)
16. Escrich E, Solanas M, Ruiz de Villa MC, Ribalta T, Muntane J, Segura R. Experimental diets for the study of lipid influence on induced mammary carcinoma in rats: II—Suitability of the diets. *In Vivo*. 1994; 8(6):1107–1111. PMID: [7772746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7772746/)
17. 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. PMID: [12171489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12171489/)
18. Karimi M, Johansson S, Stach D, Corcoran M, Grandér D, Schalling M, et al. LUMA (LUMinometric Methylation Assay)—a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp Cell Res*. 2006; 312(11):1989–1995. PMID: [16624287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16624287/)
19. Sant KE, Nahar MS, Dolinoy DC. DNA methylation screening and analysis. *Methods Mol Biol*. 2012; 889:385–406. doi: [10.1007/978-1-61779-867-2_24](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-867-2_24) PMID: [22669678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22669678/)
20. Fraga MF, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle*. 2005; 4(10):1377–1381. PMID: [16205112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16205112/)
21. Moral R, Escrich R, Solanas M, Vela E, Costa I, de Villa MC, et al. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats. *Nutr Cancer*. 2011; 63(3):410–420. doi: [10.1080/01635581.2011.535956](https://doi.org/10.1080/01635581.2011.535956) PMID: [21391126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21391126/)
22. Escrich E, Solanas M, Moral R. Olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Cancer Treat Res*. 2014; 159:289–309. doi: [10.1007/978-3-642-38007-5_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_17) PMID: [24114487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24114487/)

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

23. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(3):204–220. doi: [10.1038/nrg3354](https://doi.org/10.1038/nrg3354) PMID: [23400093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23400093/)
24. Russo J, Russo IH. Role of differentiation in pathogenesis and prevention of breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 1997; 4:7–21. doi: [10.1677/erc.0.0040007](https://doi.org/10.1677/erc.0.0040007)
25. Fraga MF, Agrelo R, Esteller M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr; 1100:60–74. PMID: [17460165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17460165/)
26. Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, James SR, Karpf AR, Latendresse JR, Beland FA, et al. Mechanisms of epigenetic silencing of the *Rassf1a* gene during estrogen-induced breast carcinogenesis in ACI rats. *Carcinogenesis.* 2010; 31(3):376–381. doi: [10.1093/carcin/bgp304](https://doi.org/10.1093/carcin/bgp304) PMID: [20008439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20008439/)
27. Kutanzi K, Kovalchuk O. Exposure to estrogen and ionizing radiation causes epigenetic dysregulation, activation of mitogen-activated protein kinase pathways, and genome instability in the mammary gland of ACI rats. *Cancer Biol Ther.* 2013; 14(7):564–573. doi: [10.4161/cbt.24599](https://doi.org/10.4161/cbt.24599) PMID: [23792640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792640/)
28. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, et al. The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106290. doi: [10.1371/journal.pone.0106290](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106290) PMID: [25184628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25184628/)
29. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (*RASSF1A*), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res.* 2001; 61(7):3105–3109. PMID: [11306494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11306494/)
30. Bachman KE, Herman JG, Com PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, et al. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res.* 1999; 59(4):798–802. PMID: [10029065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10029065/)
31. Chodosh LA. Expression of *BRCA1* and *BRCA2* in normal and neoplastic cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998; 3(4):389–402. PMID: [10819533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10819533/)
32. Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol.* 2000; 15(3):835–842. PMID: [10963127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10963127/)
33. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358(11):1148–1159. doi: [10.1056/NEJMra072067](https://doi.org/10.1056/NEJMra072067) PMID: [18337604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337604/)
34. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007; 16 Spec No 1:R50–59. PMID: [17613547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17613547/)
35. Di Francesco A, Falconi A, Di Germanio C, Micioni Di Bonaventura MV, Costa A, Caramuta S, et al. Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2015; 26(3):250–258. doi: [10.1016/j.jnutbio.2014.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.013) PMID: [25533906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533906/)
36. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(11):2291–2298. PMID: [10325416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10325416/)
37. Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(12):4415–4422. PMID: [14555514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14555514/)
38. Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukrat T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature.* 2013; 503(7476):371–376. doi: [10.1038/nature12598](https://doi.org/10.1038/nature12598) PMID: [24107992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24107992/)
39. Yenbutr P, Hilakivi-Clarke L, Passaniti A. Hypomethylation of an exon 1 estrogen receptor CpG island in spontaneous and carcinogen-induced mammary tumorigenesis in the rat. *Mech Ageing.* 1998; 106(1–2):93–102.
40. 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(3):225–235. PMID: [15567939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15567939/)
41. Solanas M, Grau L, Moral R, Vela E, Escrich R, Escrich E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis.* 2010; 31(5):871–879. doi: [10.1093/carcin/bgp243](https://doi.org/10.1093/carcin/bgp243) PMID: [19825967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19825967/)
42. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(8):853–859. doi: [10.1016/j.jnutbio.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003) PMID: [22749138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22749138/)
43. Meeran SM, Ahmed A, Tollefsbol TO. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics.* 2010; 1(3–4):101–116. PMID: [21258631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21258631/)

Anexo 4. Artículo científico de los resultados del estudio en el modelo experimental. (continuación).

44. Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80(12):1771–1792. doi: [10.1016/j.bcp.2010.06.036](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.036) PMID: [20599773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20599773/)
45. Guthrie N, Carroll KK. Specific versus non-specific effects of dietary fat on carcinogenesis. *Prog Lipid Res.* 1999; 38(3):261–271. PMID: [10664796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10664796/)

