



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL:  
EFECTOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO.**

Memoria presentada por CRISTINA DE MIGUEL PASTOR para optar al grado de Doctora en Biología Celular.

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección de la Dra. MONTSERRAT SOLANAS GARCÍA en el Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, estando adscrito al programa de Doctorado de Biología Celular.

Cristina de Miguel Pastor

Montserrat Solanas García

Bellaterra, Septiembre 2016.



Este trabajo ha sido cofinanciado en parte mediante ayudas del Ministerio de economía y competitividad/ Plan Nacional de I+D+I [2004-2007] AGL2006/ALI y [2008-2011] AGL2011-24778, Fundación Patrimonio Comunal Olivarero 2008-2012 (FPCO2008-165.396; FPCO2013-611.084), Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de Medio Ambiente y de Medio Rural y Marino (AAO2008-165.471) y “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, mi hermana y Germán.*



*Me gustaría transmitir en estas líneas mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo.*

*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 la dirección de esta tesis, sus consejos, su paciencia, su incansable trabajo y calidad profesional.*

*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 realizar esta tesis.*

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

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

*Al Dr. José Viña y a la Dra. Consuelo Borrás, profesores del departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia, por haberme aceptado generosamente en su grupo de investigación para realizar la técnica de la cromatografía líquida. Por sus valiosos consejos, sus constantes ánimos, y por todo lo aprendido durante mi estancia en el laboratorio.*

*A mis compañeros de laboratorio que me han acompañado durante estos 4 años, porque he aprendido algo de cada uno de ellos, ¡porque no podrían haber sido mejores compañeros y amigos!, gracias a Miguel por su sentido del humor y su compañerismo durante la serie experimental; a Isabel, por todos esos buenos y auténticos momentos compartidos en Rosselló 138, por su valiosa y más tarde tan añorada compañía en los ferros y Euromeds a Valencia; a Marta que pese a su breve paso por el laboratorio siempre ha sido parte del grupo, a Txell, por ser ejemplo de compañerismo y por su peculiar manera de preparar los tés. A Montse Moreno, por su bondad y constante alegría; a Elena Catalán y Alexia, por su rápida integración en el grupo, por transmitirnos su ilusión por la ciencia y sus ánimos para continuar en el mundo de la investigación más allá de la tesis; a Xiang, por sus ánimos y capacidad para hacernos reír diariamente; a Ghizlane, por su profesionalidad, sus sabios consejos, su amistad y por su compañía hasta el último día de mi paso por la UAB. Gracias especialmente a Cris, por ser la mejor compañera de fatigas, por su por su sincera amistad y cariño desde el principio, su apoyo incondicional y sus ánimos.*

*A todos los que participaron de alguna forma en la serie experimental, a Raquel Escrich por guiarme en la preparación de las primeras dietas y a Raquel Moral por brindarme su ayuda siempre que la he necesitado.*

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

*Al Dr. Xavier Navarro, Director del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, por el apoyo mostrado durante la realización de esta tesis.*

*A los profesores, resto de compañeros de la unidad de Fisiología Médica de la "Universitat Autònoma de Barcelona" por ofrecerme su ayuda siempre que la he necesitado.*

*A Hortensia Ojeda, Mónica Espejo y Ghizlane por su cordialidad y por facilitarnos el trabajo tanto a nivel administrativo como de laboratorio, y a Maite por su simpatía y alegría.*

*A mis compañeros de "Freshage" de Valencia, Cristina, Marta, Lucía, Paloma, Andrea, Tanja, Miriam, Adrián, Esther y Raquel gracias por acogermme en el grupo como si siempre hubiera estado, por darme la oportunidad de aprender nuevas técnicas, por todo el cariño recibido, y por todos los momentos vividos fuera del laboratorio: las "picaetas", los cafés, conciertos, cenas... y tantos otros!. Un agradecimiento especial a mi compañera de HPLC Mar Dromant, por su paciencia, su riguroso trabajo, por enseñarme el mundo de la cromatografía líquida y por ser ejemplo de entereza y enorme fortaleza durante esos meses. Gracias también a mi amiga del colegio Mar García, por los desayunos compartidos durante mi estancia en Valencia y sus ánimos.*

*A todas mis amigas de Guadalaviar, en especial a Clori, Isabell Lleó, Isabel Martínez, Mar, Olga y Pepa, porque hemos crecido juntas, por ser amigas de siempre.*

*A mi amiga Elena Bolón, por estar siempre ahí, por los años compartidos en el Conservatorio.*

*A mis Farmacéuticas, Almu, Sabina, Pepa, Omayra, M<sup>a</sup> Paz, M<sup>a</sup> Tere, María, Teresa y Yolanda, por su amistad y compañerismo durante los años vividos en la Facultad de Farmacia de Valencia y etapas posteriores.*

*A mis amigos del Master de Biotecnología Biomédica, en especial a Pablo, Marta, Jesús, Inés, Inma y Carmen, por todos los momentos vividos, en especial por las partidas de Truc y de "costureras".*

*A les “Filles de Montpellier”, en especial a Laura, Bea, Kity, Tere, Marina y Vivi, porque aunque nos vemos poco, están siempre ahí.*

*A mis amigas Marta y Gema por los divertidos e intensos momentos vividos en sus visitas a Barcelona, por comprender mis ausencias en fechas señaladas y por su amistad incondicional. También a Ali, Ana y Marta Moret por su amistad.*

*Gracias a mis tíos y primos, en especial a mi tía Paquita por el interés y apoyo mostrado.*

*A Elo y Germán y a Agustina, Mariajosé, Patri y Héctor, por sus constantes ánimos.*

*A mi hermana por los momentos compartidos durante el año que fuimos vecinas, por su constante compañía en las cenas, salidas y viajes a Valencia y su constante apoyo incondicional.*

*A Germán, por su paciencia, por los sacrificios que ha implicado esta tesis realizados siempre con alegría, y por su actitud siempre optimista, mi más sincero agradecimiento.*

*Esta tesis no podría haberse realizado sin la comprensión, ánimos y cariño de mi familia, es por ello que mi agradecimiento más especial se lo dedico a mis padres, por la educación, cariño y formación que me han dado, esencial para la realización de este trabajo.*



# **ÍNDICE**

**INTRODUCCIÓN**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**



ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
TABLAS ANEXO.....	XVI
ABREVIATURAS.....	XIX
RESUMEN .....	XXIII
ABSTRACT.....	XXIV
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>25</b>
1. DESARROLLO ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	1
1.1. HUMANA.....	1
1.2. RATA .....	3
2. CÁNCER DE MAMA.....	7
2.1. FACTORES ENDOCRINOS .....	9
2.2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS.....	12
2.3. FACTORES AMBIENTALES.....	18
3. LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA.....	21
3.1. CRECIMIENTO, MADURACIÓN SEXUAL Y OBESIDAD.....	24
3.2. INFLUENCIA SOBRE EL ESTATUS HORMONAL.....	27
3.3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR.....	30
3.4. EFECTOS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	33
3.5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	36
3.6. EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	39
3.7. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.....	41
4. MODELO EXPERIMENTAL .....	43
5. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL.....	49
5.1. RADICALES LIBRES. DEFINICIÓN Y FUENTES .....	49
5.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	54
5.2.1. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA .....	55

5.2.1.1. Regulación de la defensa antioxidante enzimática .....	60
5.2.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA.....	61
5.3. DAÑO EN BIOMOLÉCULAS POR EFECTO DE LOS RADICALES LIBRES....	67
5.3.1. DAÑO EN LÍPIDOS .....	67
5.3.2. DAÑO EN EL ADN .....	70
5.3.2.1. Reparación del daño en el ADN.....	71
5.3.3. DAÑO EN LAS PROTEÍNAS .....	72
5.4. DIETA, ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER. ....	75
<b>6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>80</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
1. ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	87
1.1. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES .....	87
1.2. DIETAS EXPERIMENTALES .....	87
1.3. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS .....	91
1.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	92
1.5. EXPLORACIONES PERIÓDICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA.....	94
2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS .....	97
2.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES .....	97
2.2. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA. WHOLE MOUNT. .....	98
3. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR .....	99
3.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL.....	100
3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL.....	102
3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (Real Time PCR) .....	102
3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES.....	104
3.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA. WESTERN BLOT. ....	105
3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	107
3.7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2. INMUNOPRECIPITACIÓN. ....	117
3.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN....	118

3.9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE).....	120
3.10. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNAS OXIDADAS EN PLASMA.....	123
3.11. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE 8-OHdG EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA.....	125
3.12. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE DAÑO EN EL ADN MEDIANTE EL ENSAYO COMET EN GLÁNDULA MAMARIA.....	126
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	128
4.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	128
4.1.1. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL .....	128
4.1.2. CARCINOGENESIS.....	129
4.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	130
4.3. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.....	130
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>131</b>
1. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES SANOS.....	134
1.1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL.....	134
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO.....	139
1.2.1. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA.....	139
1.2.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA.....	139
1.2.1.2. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO.....	146
1.2.2. EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN GLÁNDULA MAMARIA.....	160
1.2.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA. NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN.....	167
1.2.3.1. GSH.....	168
1.2.3.2. GSSG.....	169
1.2.3.3. GSH total.....	170
1.2.3.4. Ratio GSH/GSH total.....	171

1.2.3.5. Ratio GSH/GSSG.....	172
1.2.4. DAÑO OXIDATIVO EN LÍPIDOS. NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA.	174
2. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.....	175
2.1. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA.....	176
2.1.1. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO .....	176
2.1.1.1. Expresión génica .....	176
2.1.1.2. Actividad enzimática .....	183
2.1.1.3. Regulación de la expresión génica.....	187
2.1.2. EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN GLÁNDULA MAMARIA.....	190
2.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA. NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN.....	199
2.2.1. GSH .....	199
2.2.2. GSSG .....	200
2.2.3. GSH total.....	202
2.2.4. Ratio GSH/GSH total.....	202
2.2.5. Ratio GSH/GSSG .....	204
2.2.6. Expresión hepática de Glutación Sintasa (GSS).....	206
2.2.7. Actividad hepática Glutación Reductasa (GR).....	206
2.3. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO EN MACROMOLÉCULAS DURANTE LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.....	208
2.3.1. DAÑO OXIDATIVO EN LÍPIDOS. NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA.	208
2.3.2. DAÑO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA.....	210
2.3.2.1. Daño oxidativo. Niveles de 8-OHdG.....	210
2.3.2.2. Daño oxidativo y no oxidativo: Comet.....	211
2.3.3. DAÑO OXIDATIVO EN PROTEÍNAS EN PLASMA .....	213
2.4. REPARACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA.....	214
2.4.1. Expresión de OGG .....	214
2.4.2. Expresión de PARP .....	214

3. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL, LA CARCINOGENÉISIS MAMARIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES INDUCIDOS CON EL CARCINÓGENO .....	218
3.1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL.....	218
3.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA.....	222
3.2.1. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO.....	222
3.2.1.1. Expresión génica.....	222
3.2.1.2. Actividad enzimática.....	224
3.2.1.3. Regulación de la expresión génica.....	225
3.2.2. EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN GLÁNDULA MAMARIA.....	227
3.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA. NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN .....	229
3.4. DAÑO OXIDATIVO EN MACROMOLÉCULAS .....	231
3.4.1. DAÑO OXIDATIVO EN LÍPIDOS. NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA. 231	
3.4.2. DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA. NIVELES DE 8-OHdG .....	231
3.4.3. REPARACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA .....	232
3.5. CARCINOGENÉISIS MAMARIA EXPERIMENTAL.....	234
3.5.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	234
3.5.1.1. Estructuras proliferativas y epiteliales.....	234
3.5.1.2. Densidad de la glándula mamaria.....	238
3.5.2. PARÁMETROS CLÍNICOS DE LA CARCINOGENÉISIS.....	240
3.5.2.1. Patología de las lesiones mamarias observadas. Clasificación histopatológica.....	240
3.5.2.2. Tiempo de latencia.....	241
3.5.2.3. Incidencia.....	243
3.5.2.4. Contenido tumoral .....	244
3.5.2.5. Volumen tumoral.....	246

<b>DISCUSIÓN</b> .....	251
1. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES SANOS.....	254
2. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS .....	263
3. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL, LA CARCINOGENESIS MAMARIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES INDUCIDOS CON EL CARCINOGENO.....	272
4. DISCUSIÓN INTEGRADA .....	283
<b>CONCLUSIONES</b> .....	290
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	297
<b>ANEXO</b> .....	339

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara.....	4
Figura 2. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria (Russo and Russo, 2004). ...	5
Figura 3. Topografía de la glándula mamaria de rata. ....	6
Figura 4. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres.....	9
Figura 5. Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). ....	44
Figura 6. Cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	54
Figura 7. Metabolismo de glutatión en una célula de mamífero representativa .....	63
Figura 8. Proceso de peroxidación lipídica (Schaur et al., 2015). ....	68
Figura 9. Formación de la base modificada 8-oxo-dG por el ataque de un radical $\cdot\text{OH}$ sobre la guanina.....	71
Figura 10. Diseño de la serie experimental. ....	93
Figura 11. Exploraciones periódicas de los animales.....	96
Figura 12. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad CAT. ....	108
Figura 13. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad GPx.....	110
Figura 14. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad GR.....	113
Figura 15. Fundamento del ensayo de actividad SOD.....	115
Figura 16. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad SOD. ....	116
Figura 17. Diseño estándar de una placa para la determinación GSH/GSSG.....	119
Figura 18. Programación de la duración (minutos) de las fases A y B durante un cromatograma del análisis de MDA. ....	122
Figura 19. Cromatograma de una muestra problema.....	123
Figura 20. Imagen representativa del ensayo comet.....	127
Figura 21. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales sanos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.....	136
Figura 22. Evolución del Índice de Lee de los animales sanos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.....	137

## Índice

Figura 23. Evolución del Índice de Masa Corporal de los animales sanos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.....	138
Figura 24. Perfil de expresión de las enzimas antioxidantes en hígado de animales sanos a diferentes edades según el tipo de dieta administrada.....	142
Figura 25. Perfil de expresión de las enzimas antioxidantes en glándula mamaria de animales sanos a diferentes edades según el tipo de dieta administrada. ....	143
Figura 26. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en hígado de animales sanos.. .....	147
Figura 27. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en hígado de animales sanos. ....	148
Figura 28. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en hígado de animales sanos. ....	149
Figura 29. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en hígado de animales sanos.....	150
Figura 30. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en hígado de animales sanos.....	151
Figura 31. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en hígado de animales sanos.....	153
Figura 32. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de CAT en hígado de animales sanos.....	155
Figura 33. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de SOD en hígado de animales sanos.....	156
Figura 34. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de GPX en hígado de animales sanos.....	157
Figura 35. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de NRF2 en hígado de animales sanos.....	159
Figura 36. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de retención citoplasmática de NRF2 en hígado de animales sanos.....	160
Figura 37. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en glándula mamaria de animales sanos.....	161

Figura 38. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en glándula mamaria de animales sanos.....	162
Figura 39. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en glándula mamaria de animales sanos.....	163
Figura 40. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en glándula mamaria de animales sanos.....	165
Figura 41. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en glándula mamaria de animales sanos.....	166
Figura 42. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en glándula mamaria de animales sanos.....	167
Figura 43. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH ( $\mu\text{M}$ ) en plasma de animales sanos.....	168
Figura 44. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSSG ( $\mu\text{M}$ ) en plasma de animales sanos.....	169
Figura 45. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH total ( $\mu\text{M}$ ) en plasma de animales sanos.....	171
Figura 46. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/GSH total (%) de animales sanos.....	172
Figura 47. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/GSSG en plasma de animales sanos.....	173
Figura 48. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma de animales sanos.....	174
Figura 49. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en hígado tras la administración del carcinógeno.....	177
Figura 50. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en hígado tras la administración del carcinógeno.....	178
Figura 51. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en hígado tras la administración del carcinógeno.....	179
Figura 52. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en hígado tras la administración del carcinógeno.....	180
Figura 53. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en hígado tras la administración del carcinógeno.....	182

## Índice

Figura 54. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en hígado tras la administración del carcinógeno. ....	183
Figura 55. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de CAT tras la administración del carcinógeno.....	184
Figura 56. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de SOD tras la administración del carcinógeno. ....	186
Figura 57. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de GPX tras la administración del carcinógeno.....	187
Figura 58. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de NRF2 en hígado tras la administración del carcinógeno. ....	188
Figura 59. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de retención citoplasmática de NRF2 en hígado tras la administración del carcinógeno. ....	190
Figura 60. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	191
Figura 61. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	193
Figura 62. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	194
Figura 63. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	195
Figura 64. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	197
Figura 65. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno. ....	198

Figura 66. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH ( $\mu\text{M}$ ) en plasma tras la administración del carcinógeno.....	200
Figura 67. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSSG ( $\mu\text{M}$ ) en plasma tras la administración del carcinógeno.....	201
Figura 68. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH total ( $\mu\text{M}$ ) en plasma tras la administración del carcinógeno.....	203
Figura 69. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/ GSH total (%) en plasma tras la administración del carcinógeno.....	204
Figura 70. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/GSSG en plasma tras la administración del carcinógeno.....	205
Figura 71. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GSS en hígado tras la administración del carcinógeno.....	207
Figura 72. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de GR tras la administración del carcinógeno.....	208
Figura 73. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma tras la administración del carcinógeno.....	209
Figura 74. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de 8-OHdG en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	211
Figura 75. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de daño genómico total tras la administración del carcinógeno en glándula mamaria.....	212
Figura 76. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de proteínas oxidadas en plasma tras la administración del carcinógeno.....	213
Figura 77. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima OGG en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	215
Figura 78. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima PARP en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	216
Figura 79. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales inducidos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.....	219
Figura 80. Evolución del Índice de Lee de los animales inducidos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.....	220

## Índice

Figura 81. Evolución del Índice de Masa Corporal de los animales inducidos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.....	221
Figura 82. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de las enzimas .....	223
Figura 83. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de las enzimas CAT (A), SOD (B), GPX (C), en hígado de animales adultos previamente inducidos con DMBA.....	224
Figura 84. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de A. proteína NRF2 y B. retención citoplasmática de NRF2 en hígado de animales previamente inducidos con DMBA;.....	226
Figura 85. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de las enzimas. ....	228
Figura 86. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la concentración de GSH ( $\mu\text{M}$ ) (A), GSSG ( $\mu\text{M}$ ) (B); GSH total ( $\mu\text{M}$ ) (C); y las ratios GSH/GSH total (D), GSH/GSSG (E) en plasma en animales adultos previamente inducidos. ....	230
Figura 87. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma en animales adultos previamente inducidos.....	231
Figura 88. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de 8-OHdG en glándula mamaria de animales adultos (150 días) previamente inducidos.....	232
Figura 89. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima A. OGG y B. PARP en glándula de animales adultos (150 días) previamente inducidos. C. Parámetros estadísticos. ....	233
Figura 90. Imagen representativa de las diferentes estructuras en glándula mamaria de rata en animales adultos (100 días) previamente inducidos.....	235
Figura 91. Estructuras proliferativas epiteliales.....	237
Figura 92. Categorización cualitativa de la glándula mamaria en función de su grado de densidad estructural. ....	238
Figura 93. Imágenes histopatológicas representativas de los adenocarcinomas mamaros de los diferentes grupos experimentales.....	241
Figura 94. Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.. ....	243

Figura 95. Contenido tumoral total de la patología mamaria maligna en los diferentes grupos experimentales..... 245

Figura 96. Contenido tumoral medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales..... 246

Figura 97. Volumen tumoral total de la patología mamaria maligna en los diferentes grupos experimentales..... 248

Figura 98. Volumen tumoral medio por animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales..... 249

Figura 99. Volumen medio por tumor en la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales..... 250

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales (g/100g dieta).....	89
Tabla 2. Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados.....	90
Tabla 3. Ensayos <i>TaqMan</i> ® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante <i>Real Time-PCR</i> .....	104
Tabla 4. Esquema de los reactivos añadidos en cada pocillo en el ensayo de actividad SOD.....	116
Tabla 5. Expresión de las enzimas antioxidantes en hígado y glándula mamaria de animales sanos de los diferentes grupos experimentales.....	141
Tabla 6. Análisis estadístico del estudio de la expresión a lo largo del tiempo de las diferentes enzimas antioxidantes en hígado y glándula mamaria de animales sanos.....	144
Tabla 7. Análisis estadístico de la comparación de la expresión de las enzimas antioxidantes a lo largo del tiempo entre hígado y glándula mamaria de animales sanos.....	144
Tabla 8. Análisis estadístico del estudio de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes en cada una de las edades estudiadas en hígado y glándula mamaria de animales sanos.....	145
Tabla 9. Análisis estadístico de los cambios en la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes por efecto de la edad en hígado y glándula mamaria de animales sanos.....	146
Tabla 10. Efecto de los lípidos de la dieta sobre diferentes parámetros de estrés oxidativo en la iniciación de la carcinogénesis mamaria.....	217
Tabla 11. Efecto de los lípidos de la dieta sobre diferentes parámetros de estrés oxidativo en la carcinogénesis mamaria a entre 100 y 150 días de edad. ...	233
Tabla 12. Análisis estadístico del grado de densidad de la glándula mamaria en los diferentes grupos experimentales.....	239
Tabla 13. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio.....	240
Tabla 14. Tiempo de aparición del primer tumor en los diferentes grupos experimentales.....	241

Tabla 15. Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales. .... 242

Tabla 16. Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. .... 242

Tabla 17. Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales. .... 242

## TABLAS ANEXO

Anexo Tabla 1. Correlación entre la expresión y actividad CAT en hígado de animales sanos.....	339
Anexo Tabla 2. Correlación entre la expresión de SOD1 y de SOD2 y la actividad SOD en hígado de animales sanos. ....	340
Anexo Tabla 3. Correlación entre la expresión de GPX1 y de GPX4 y la actividad GPX en hígado de animales sanos. ....	341
Anexo Tabla 4. Correlaciones entre los niveles de NRF2 total y NRF2 unido a KEAP1 y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR en hígado de animales sanos. ....	342
Anexo Tabla 5. Correlación de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes entre hígado y glándula mamaria de animales sanos. ....	343
Anexo Tabla 6. Correlación entre los parámetros de glutatión en plasma de animales sanos.....	344
Anexo Tabla 7. Correlación entre la actividad hepática de GPX y los niveles plasmáticos de GSH y de GSSG en animales sanos.....	345
Anexo Tabla 8. Correlación entre la expresión y actividad CAT hepática tras la administración del carcinógeno.....	346
Anexo Tabla 9. Correlación entre la expresión de SOD1 y de SOD2 y la actividad SOD en hígado tras la administración del carcinógeno.....	347
Anexo Tabla 10. Correlación entre la expresión de GPX1 y de GPX4 y la actividad GPX en hígado tras la administración del carcinógeno.....	348
Anexo Tabla 11. Correlación entre los niveles de NRF total y NRF2 unido a KEAP1 y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR en hígado tras la administración del carcinógeno. ....	349
Anexo Tabla 12. Correlación de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes entre hígado y glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	350
Anexo Tabla 13. Correlación entre la expresión de SOD1 y SOD2 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	351
Anexo Tabla 14. Correlación entre la expresión de GPX1 y GPX4 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.....	351

Anexo Tabla 15. Correlación entre los parámetros de glutatión en plasma tras la administración del carcinógeno.....	352
Anexo Tabla 16. Correlación entre la actividad hepática de GPX y los niveles plasmáticos de GSH y GSSG tras la administración del carcinógeno. ....	353
Anexo Tabla 17. Correlación entre los niveles relativos de expresión de GSS y los niveles de GSH total tras la administración del carcinógeno.....	354
Anexo Tabla 18. Correlación entre os niveles de actividad de GR y los niveles de GSH tras la administración del carcinógeno.....	354
Anexo Tabla 19. Correlación entre los niveles de MDA y 8-OHdG y Proteínas oxidadas tras la inducción con el carcinógeno.....	355
Anexo Tabla 20. Correlación entre los niveles de expresión de PARP y OGG y los niveles de 8-OHdG tras la administración del carcinógeno.....	356
Anexo Tabla 21. Correlación entre la expresión y actividad CAT en hígado de animales adultos previamente inducidos. ....	357
Anexo Tabla 22. Correlación entre la expresión de SOD1 y SOD2 y la actividad SOD en hígado de animales adultos previamente inducidos.....	357
Anexo Tabla 23. Correlación entre la expresión de GPX1 t GPX4 y la actividad GPX en hígado de animales adultos previamente inducidos. ....	358
Anexo Tabla 24. Correlación entre los niveles de NRF2 total y NRF2 unido a KEAP1 y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR en hígado de animales adultos previamente inducidos. ....	359
Anexo Tabla 25. Correlación de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes entre hígado y glándula mamaria de animales adultos previamente inducidos. ....	359
Anexo Tabla 26. Correlación entre la expresión SOD1 y SOD2 en glándula mamaria de animales adultos previamente inducidos. ....	360
Anexo Tabla 27. Correlación entre la expresión de GPX1 y GPX4 en glándula mamaria en animales adultos previmante inducidos.....	360
Anexo Tabla 28. Correlación entre los parámetros de GSH en plasma en animales adultos previamente inducidos.....	361
Anexo Tabla 29. Correlación entre la actividad hepática de GPX y los niveles plasmáticos de GSH y GSSG en animales adultos previamente inducidos. ....	362

## *Índice*

Anexo Tabla 30. Correlación entre los niveles de MDA y 8-OHdG en animales adultos previamente inducidos. ....	362
Anexo Tabla 31. Correlación entre los niveles de expresión de PARP y OGG y los niveles de 8-OHdG en animales adultos previamente inducidos. ....	363

## ABREVIATURAS

C	grupo experimental control (dieta normolipídica)
Ms	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de maíz
Os	grupo experimental de dieta hiperlipídica de aceite de oliva virgen
Dieta m3	dieta experimental normolipídica
Dieta M20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de maíz
Dieta mO20	dieta experimental hiperlipídica de aceite de oliva virgen extra
8-OHdG	8-hidroxi-desoxiguanosina
AB	yema alveolar
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
ALA	ácido $\alpha$ -lipoico
AHR	receptor de aril hidrocarburos
ARE	elemento de respuesta antioxidante
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
BER	sistema de excisión de base
BRCA	<i>breast cancer</i>
BSA	albúmina de suero bovino
$\beta$ ME	$\beta$ -mercaptoetanol
CAT	catalasa
CLA	ácido linoleico conjugado
CLAE	cromatografía líquida de alta eficacia
cGPX	glutatiión peroxidasa citosólica
CuZnSOD	SOD citosólica
CYP	citocromo P450

## Índice

DAG	diacilglicerol
DHA	ácido docosahexanoico
DMBA	7,12-dimetilbenz-( $\alpha$ )antraceno
DTNB	ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
ECSOD	SOD extracelular
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPA	ácido eicosapentanoico
EWS	enzyme working solution
GAM	<i>GSH assay mixture</i>
GCL	glutamato cisteína ligasa
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
giGPX	GPX gastrointestinal
GPX	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GSS	glutación sintasa
GSSG	glutación oxidado
GST	glutación transferasa
H	hiperplasias
HPRT	hipoxantina guanina fosforibosil transferasa 1
IMC	índice de masa corporal
IP	inmunoprecipitado
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
KEAP1	proteína <i>Kelch-like ECH-associated</i>
MDA	malondialdehído
MnSOD	SOD mitocondrial
MUFA	ácido graso monoinsaturado
NaCl	cloruro de sodio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF $\kappa$ B	factor nuclear $\kappa$ B
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1

NRF2	factor nuclear (derivado eritroide 2)
OEA	oleiletanolamida
OGG1	8-oxoguanina-DNA glycosylasa
PAHs	hidrocarburos aromáticos policíclicos
PARP1	Poly-(ADP-ribose) polymerase 1
PBS	suero fetal bovino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pGPX	GPX plasmática
PIDL	proliferaciones intra-ductolobulillares
PUFA	ácido graso poliinsaturado
RE	receptor de estrógenos
RP	receptor de progesterona
ROS	especies reactivas de oxígeno
SDS	dodecilsulfato sódico
T	tumores
TDLU	unidad ductulo-lobulillar terminal de la glándula mamaria humana
TDs	ductos terminales
TEBs	yemas terminales de la glándula mamaria de la rata
TGAM	<i>total GSH assay mixture</i>
TRX	tiorredoxina
TBA	ácido tiobarbitúrico
WST	sal de tetrazolio
XMEs	enzimas metabolizadoras de xenobióticos

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



## RESUMEN

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres de todo el mundo. Además de los factores genéticos, epigenéticos y hormonales, existen evidencias epidemiológicas y experimentales de que los factores nutricionales y ambientales tienen un papel en la etiología y el desarrollo de esta enfermedad. Los lípidos de la dieta se han relacionado directamente con el cáncer, fundamentalmente, el de mama. Resultados previos demostraron que las dietas hiperlipídicas de aceite de maíz, rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-6, y el aceite de oliva virgen extra, rico en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) n-9 y diversos compuestos bioactivos, ejercen un efecto estimulador y potencialmente protector, respectivamente, en el cáncer de mama experimental. Estos efectos se realizan durante la etapa de la promoción de la carcinogénesis, pero existen indicios de una influencia sobre la iniciación. El objetivo de este trabajo fue investigar si estos lípidos podían ejercer sus efectos moduladores mediante cambios en el estado de estrés oxidativo en el organismo a diferentes niveles: en el animal sano, en la etapa de la iniciación de la carcinogénesis y en el animal adulto afectado de cáncer de mama. Así, se desarrolló una serie experimental basada en el modelo de cáncer de mama inducido en la rata *Sprague Dawley* con el hidrocarburo aromático policíclico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). Se estudiaron la defensa antioxidante enzimática, mediante la expresión de las enzimas CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR en hígado y glándula mamaria y su actividad en hígado, y la no-enzimática, mediante los parámetros del glutatión en plasma GSHtotal, GSH, GSSG, GSH/GSHtotal y GSH/GSSG. Además, se estudió el daño oxidativo en lípidos y proteínas en plasma, y en el ADN de la glándula mamaria, mediante los niveles de 8-OHdG y la expresión de las enzimas de reparación OGG y PARP. Los resultados mostraron que, en general, las dietas hiperlipídicas aumentaron el nivel de estrés oxidativo en comparación a la dieta control. Este efecto fue mayor para la dieta de aceite de maíz, tanto en los animales sanos como, sobre todo, en la etapa de la iniciación de la carcinogénesis. Ello se correspondió con una aparición más temprana de la enfermedad y mayores incidencia y contenido tumorales. En cambio, la dieta rica en aceite de oliva tuvo un efecto débilmente estimulador de la carcinogénesis y se asoció a unos niveles de estrés oxidativo en hígado y plasma intermedios entre los inducidos por la dieta de aceite de maíz y la control, tanto en los animales sanos como durante la iniciación. En la glándula mamaria iniciada los lípidos de la dieta ejercieron sus efectos sobre los parámetros de estrés mediante mecanismos específicos. Finalmente, los lípidos de la dieta ejercieron una influencia mucho menor sobre el estrés oxidativo una vez el cáncer está establecido.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy among women all over the world. Besides the genetic, epigenetic and hormonal factors, there are epidemiologic and experimental evidences that nutritional and environment factors have a role in the etiology and the development of this cancer. The dietary lipids are directly related with cancer, mainly breast cancer. Previous results have demonstrated that high corn oil, rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) n-6, and the high extra virgin olive oil diets, rich in monounsaturated fatty acids (MUFA) n-9 and several bioactive compounds, in the experimental breast cancer, resulting in a stimulating and a potentially protective effect, respectively. These diets mostly acted on the carcinogenesis promotion stage, but there are evidences of their action on the initiation stage. The aim of this study was to investigate whether these lipids could exert their modulatory effects through changes on the oxidative stress state in the organism at different levels: in the healthy animal, in the carcinogenesis initiation stage and in the tumor-bearing adult animal. Results proceed from an experimental series, developed in the breast cancer model induced in the Sprague-Dawley rat with the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). The antioxidant enzymatic defense was studied through CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 and GR expression on the liver and mammary gland, and the non-enzymatic defense through total GSH, GSH, GSSG, GSH/GSHtotal and GSH/GSSG glutathione parameters in plasma. Furthermore, plasmatic oxidative damage in lipids and proteins, and DNA damage in the mammary gland through 8-OHdG levels and repair enzymes OGG and PARP were determined. Results showed that, high fat diets increased oxidative levels comparing with the control diet. The high corn oil diet showed a higher effect, both in healthy and especially in the carcinogenesis initiation stage. This was in accordance with an earlier tumor appearance and higher tumor content due to the high corn oil diet. On the other hand, the high extra virgin olive oil diet showed a weak stimulatory effect which was associated with intermediate oxidative stress levels in serum and liver between the high corn oil and control diets, both in healthy and initiated animals. In the initiated mammary gland, dietary lipids exerted their effects on the oxidative stress parameters through specific mechanisms. Finally, once cancer disease was established, dietary lipids exerted a much lower effect.

**ÍNDICE**

**INTRODUCCIÓN**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**







# 1. 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.

## 1.1. HUMANA

En humanos, la formación de la estructura tubular de la glándula mamaria se inicia en el tercer mes de embarazo a partir del ectodermo. En el recién nacido, dicha glándula consiste en un sistema rudimentario ramificado de ductos que permanece en estado quiescente hasta la pubertad (Delouis et al., 1980; Netter, 1982; Houdebine, 1986; Imagawa W, 1994).

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

## *Introducción*

La diferenciación de la mama como glándula lobulillar se completa después de la menarquia, aunque prosigue a un ritmo que está relacionado con la intensidad de los estímulos hormonales durante cada ciclo menstrual y, en especial, durante el embarazo. En cada ciclo menstrual, las estructuras glandulares sufrirán, en primer lugar, una fase de crecimiento que progresa durante la fase folicular y periovulatoria, alcanzando un máximo en la fase luteal, y a continuación se produce una rápida involución. El balance entre la proliferación y la involución en edades reproductivas tempranas favorece la proliferación, existiendo un aumento del número de células en cada ciclo ovulatorio (Birkenfeld and Kase, 1994; Imagawa W, 1994; Yen, 1993a; Reid et al., 1996; Graham and Clarke, 1997).

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 (Birkenfeld and Kase, 1994; Clarke et al., 2004). Asimismo, interviene una compleja secuencia hormonal en la que participan prolactina, insulina, cortisol, tiroxina, hormona del crecimiento y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Delouis et al., 1980; Netter, 1982; Houdebine, 1986; Birkenfeld and Kase, 1994; Keller-Wood, 1991; Santen, 1993; Graham and Clarke, 1997; Rosen et al., 1994; Benaud et al., 1998). 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 (Kimata et al., 1985; Imagawa W, 1994).

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

Durante el embarazo se produce la expansión plena del sistema lobulilloalveolar, necesaria para la secreción de leche, alcanzando el estado de máxima diferenciación de la glándula mamaria, representado por los lobulillos tipo 4, los cuales presentan capacidad secretora (Rosen JM, 1980; Delouis et al., 1980; Houdebine, 1986;

Birkenfeld and Kase, 1994; Keller-Wood, 1991; Yen, 1993b; Catt, 1993; Russo et al., 1990).

Cuando cesa la lactancia, la glándula mamaria interrumpe rápidamente su actividad secretora y sufre una fase de regresión rápida. En el epitelio alveolar se desarrolla una importante actividad autofágica y lisosomal que elimina los restos celulares. La mayoría de lobulillos tipo 4 regresan, retornando a lobulillos tipo 2 y 3, siendo ésta última la estructura predominante en las mamas de mujeres premenopáusicas multíparas (Russo et al., 1990; Russo, 1997).

Después de la menopausia, la caída de estrógenos y progesterona causa la involución progresiva de los tejidos epitelial y conectivo, así como la atrofia del componente ductulo-lobulillar. La mayoría de los lobulillos adquieren la apariencia morfológica de los de tipo 1, y la actividad proliferativa de éstos es menor en glándulas mamarias de mujeres post-menopáusicas multíparas que en las nulíparas, lo que indica que la gestación puede imprimir cambios permanentes en las características biológicas de estas estructuras (Russo and Russo, 1997; Weiss, 1982; Rosen, 1992).

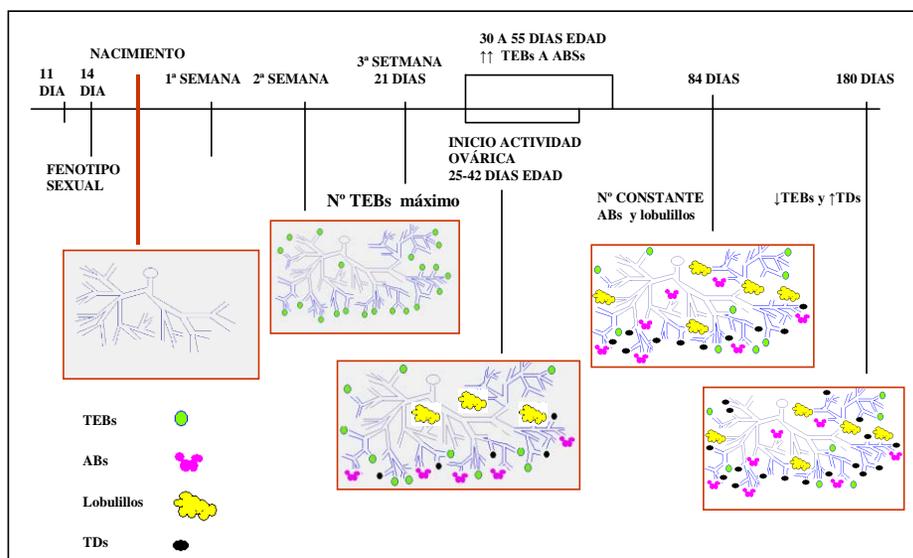
## 1.2. RATA

A diferencia de los humanos, la rata posee 6 pares de glándulas mamarias: un par en la región cervical, dos en la región torácica, dos en la abdominal y uno en la inguinal (Young and Hallows, 1973). El desarrollo de la glándula mamaria de la rata virgen nulípara se esquematiza en la Figura 1.

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 (Russo and Russo, 1996a). En la rata *Sprague-Dawley*, la glándula mamaria evoluciona desde un ducto galactóforo mayor primordial que nace del pezón y que se ramifica en ductos secundarios, cuyas longitudes y número de ramas secundarias y terciarias aumentarán con la edad del animal. Hacia la segunda semana de vida, la glándula muestra ductos con ramificaciones que en su extremo presentan las yemas terminales (*Terminal End Buds*, TEBs), el equivalente de las TDLU humanas, considerados los centros de

## Introducción

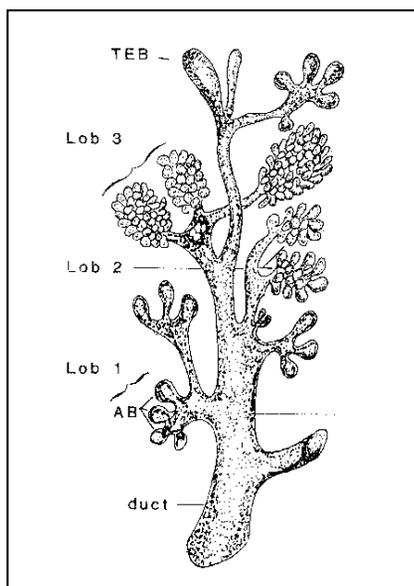
crecimiento activo. El número de TEBs es máximo cuando la rata tiene 21 días de edad. A partir de aquí, coincidiendo con el período prepuberal y el inicio de la actividad ovárica, los TEBs inician la diferenciación y septación a 3-5 yemas alveolares o (*Alveolar Buds*, ABs). Esta diferenciación progresiva se acentuará en cada ciclo estral. Los ABs, a su vez, en los sucesivos ciclos estrales iniciarán el desarrollo lobulillar, con la aparición de lobulillos tipo 1 y 2 (Russo and Russo, 1997). En las ratas vírgenes este proceso continúa durante la maduración sexual (King, 1983). Un número elevado de TEBs sufrirá hipoplasia en la rata virgen, constituyendo los ductos terminales (*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 2).



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

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 (Russo and Russo, 1996a).



**Figura 2. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria (Russo and Russo, 2004).**

La topografía de la glándula mamaria indica que existen diferentes áreas que difieren en su morfología, características cinéticas, respuesta a estímulo hormonal y potencial carcinogénico (Weisburger, 1997). Estas áreas resultan de dividir en tres tercios el parénquima mamario, a través del eje longitudinal (Figura 3). La zona A es la más cercana al pezón y es donde se encuentran los ductos galactóforos principales y los secundarios. Las ramificaciones de estos últimos se encuentran en la zona B. Finalmente, la zona C presenta un crecimiento activo y es rica en estructuras ductales terminales que acaban en TEBs y TDs. Durante la maduración a ABs, disminuye marcadamente el número de TEBs en las zonas A y B, donde predominan los lobulillos y los ABs, respectivamente, pero no en la zona C. Aunque todas las glándulas mamarias están constituidas por las tres zonas descritas, la cantidad y el tamaño de cada una de las estructuras morfológicas, así como el área glandular difieren según la localización anatómica. Así, las glándulas torácicas tienen más y mayores TEBs que las abdominales ya que muestran un enlentecimiento en la diferenciación (Russo et al., 1990). Éste desaparece con la edad, de manera que

## Introducción

dichas glándulas terminan presentando el grado de desarrollo observado en el resto de localizaciones topográficas (Russo and Russo, 1996b).

En la glándula mamaria de rata, igual que en la humana, los lobulillos maduran a partir de estructuras menos complejas, los lobulillos tipo 1 (Lob1), con 5-15 ductulillos, a lobulillos tipo 2 (Lob2), con 40-60 ductulillos, y a lobulillos tipo 3 (Lob3), con más de 65-70 ductulillos. El desarrollo glandular dependerá de diversos factores, entre ellos el número de ciclos ocurridos, la dieta y las características genéticas específicas del animal, pero la diferenciación completa de la glándula mamaria se alcanza con el embarazo y la lactancia. Los lobulillos durante la gestación y la lactancia son de tipo 3 y 4. Esta diferenciación es mayor en la zona A que en la B. Aquellos animales que han completado la gestación muestran, además, extenso desarrollo lobulillar en la zona C (Russo and Russo, 2004).

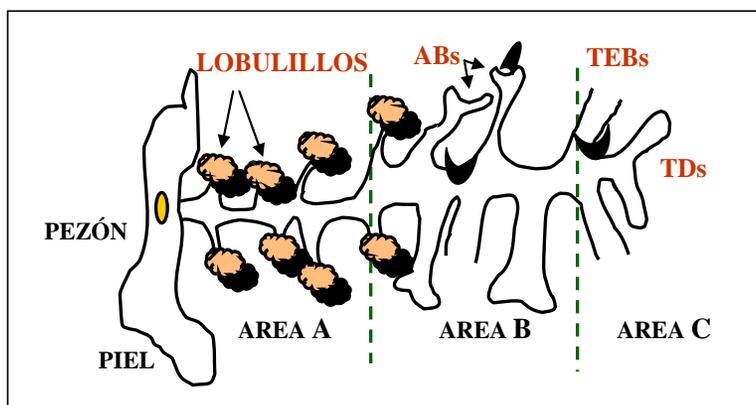


Figura 3. Topografía de la glándula mamaria de rata.

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

## 2. CÁNCER DE MAMA

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

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres en todo el mundo (Parkin, 2002; Siegel et al., 2012) y es el responsable de aproximadamente 1,38 millones de neoplasias diagnosticadas en 2008 (un 23% de todos los tipos de cáncer). Es, además, la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres (Ferlay, 2014). En los países desarrollados se ha constatado un aumento acelerado de la incidencia en los últimos 20 años, lo cual se ha relacionado con una mayor exposición a factores de riesgo, aunque también deben considerarse otros factores, como la mejora en los métodos diagnósticos que permiten detectar casos que antes quedaban sin registrar correctamente (Moreno, 2001; Botha et al., 2003; Siegel et al., 2012). Por otra parte, los estudios epidemiológicos muestran variaciones geográficas importantes de la incidencia del cáncer de mama (WCRF/AICR, 2007; Ferlay, 2014) (Figura 4). A nivel mundial, las tasas brutas de incidencia más altas corresponden a la población blanca de los Estados Unidos. Los registros poblacionales de Canadá, Israel y diversos países europeos están en la lista de las áreas de tasas de incidencia más elevada, mientras que las más bajas se registran en África y Asia y en la población no judía de Israel.

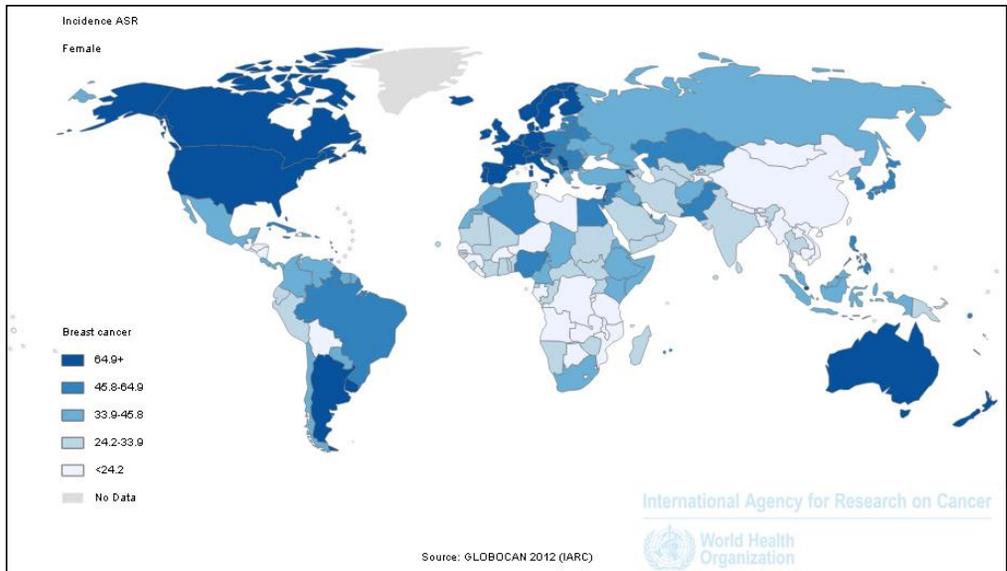
En España la incidencia es más baja que en otros países de Europa, aunque se ha registrado un aumento del número de casos desde la década de 1980 hasta el año 2000 (Pollan et al., 2009; Borrás et al., 2008a; Borrás et al., 2008b; Marcos-Gragera et al., 2008). De hecho, según los últimos datos publicados, en España el cáncer de mama es el que presenta más incidencia y mortalidad ([www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)). En relación a Cataluña, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años, aunque en el contexto europeo sigue siendo de las más bajas (Borrás et al., 2008a; Marcos-Gragera et al., 2008).

El cáncer de mama constituye una entidad clínica y patológica muy heterogénea, con una gran variedad de características morfológicas, moleculares, de

comportamiento y de respuesta al tratamiento, lo que ha llevado a intentar delimitar grupos con valor pronóstico y predictivo que permitan un adecuado manejo de las pacientes. En cuanto a las características morfológicas, en la clasificación de las lesiones mamarias propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los carcinomas de mama forman parte del grupo de los tumores epiteliales, en el que se incluyen, además, las afecciones benignas, tumorales o proliferativas. Los carcinomas de mama pueden ser, a su vez, preinvasores o *in situ* e invasores (WHO/IARC, 2012). La clasificación anatomopatológica del cáncer de mama, basada clásicamente en criterios morfológicos (Azzopardi et al., 1982), se ha complementado con la detección de las anomalías moleculares mediante técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ*, que permiten el estudio sobre el tumor. Los parámetros moleculares más relevantes y con valor reconocido para estratificar a las pacientes en grupos pronósticos y predictivos son los receptores hormonales de estrógenos (RE) y progesterona (RP) y p185<sup>neu</sup> o HER2, y menos establecidos, p53 y Ki67 (Taneja et al., 2010). Los carcinomas de mama se clasifican en hormonodependientes y hormonoindependientes, según la expresión de RE y RP, especialmente con referencia a Re $\alpha$ .

Actualmente se considera que las variaciones en los programas transcripcionales pueden explicar, en parte, la gran diversidad del cáncer de mama y, a su vez corresponde con la diversidad fenotípica que exhiben estos tumores. En este sentido, estudios con *microarrays* de ADN complementario (ADNc) han permitido determinar grupos moleculares de cáncer de mama, según el patrón de genes expresados, lo cual, asociado con los conocimientos morfológicos previos ha permitido elaborar una nueva clasificación en la que se reconocen como grupos perfilados: 1) el grupo luminal A (que expresa RE y CK8/18; histológicamente suelen ser de bajo grado y responden a hormonoterapia); 2) el luminal B (con expresión de RE, pero en niveles más bajos, que característicamente muestran expresión de genes relacionados con la proliferación celular, con expresión elevada de Ki67 y expresión de CK8/18; y que histológicamente son de mayor grado, menos hormonosensibles y con peor pronóstico que el luminal A); y 3) los grupos RE negativos, que se describen como carcinomas histológicamente mal diferenciados: el *basal-like* (con ausencia de sobreexpresión de HER2, con expresión de CK5/6 y 14,

que responden a quimioterapia con antraciclinas y taxanos) y HER2+ (con amplificación y sobreexpresión de *c-erc-B2*, y que responden, además de a quimioterapia, a trastuzumab). En ambos casos, con peor pronóstico que los grupos RE+, probablemente por su alto riesgo de recaída temprana. Además, se han descrito nuevos grupos moleculares, como el apocrino (receptores de andrógenos positivos y RE-) y el *Claudin-Low* (Sotiriou and Pusztai, 2009; Weigelt et al., 2008; Prat and Perou, 2011).



**Figura 4. Tasas de incidencia por países de cáncer de mama en mujeres.** (Ferlay, 2014).

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

## 2.1. FACTORES ENDOCRINOS

La etiología y progresión del cáncer de mama tienen un fuerte componente hormonal. Así, los estrógenos, fundamentalmente estradiol y estrona, y los andrógenos, a concentraciones fisiológicas, estimulan la proliferación de las células

## Introducción

tumorales mamarias. Las dosis farmacológicas de progesterona, la insulina y la prolactina, también ejercen un efecto estimulador. En cambio, los estrógenos y los andrógenos a dosis farmacológicas y las dosis fisiológicas de progesterona son inhibidores. Las maniobras terapéuticas ablativas como la ovariectomía, la hipofisectomía y la adrenalectomía, provocan la regresión tumoral. El embarazo ejerce un efecto protector si precede a la transformación de la glándula mamaria y un efecto estimulador si es posterior. El efecto protector del embarazo, así como el de la gonadotropina coriónica humana, está relacionado con la diferenciación de la glándula, asociada con la depresión de la proliferación celular y la síntesis de inhibina por las células epiteliales mamarias (Russo and Russo, 1994; Srivastava et al., 1998). Por otro lado, en mujeres postmenopáusicas, la fuente de estrógenos es el tejido adiposo. En éste, un sistema enzimático de aromatasas P450 convierte los andrógenos, secretados por la glándula adrenal, en estrógenos. Por lo tanto, mujeres con un incremento en la grasa corporal presentaran niveles incrementados de estrógenos y un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Keen and Davidson, 2003).

Diversos trabajos experimentales demuestran que los estrógenos desempeñan una función en la iniciación, promoción y desarrollo del cáncer de mama. Clásicamente se ha considerado que estas hormonas ejercían un papel en la carcinogénesis mamaria fundamentalmente como promotoras, pero también podrían actuar en la iniciación como co-carcinógenos, potenciando o facilitando la acción del agente carcinogénico (Howell, 1993; Ibrahim and Hortobagyi, 1998). 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 (Wren, 2004; Ibrahim and Hortobagyi, 1998; Power and Thompson, 2003). Además, se ha indicado que los estrógenos son agentes genotóxicos ya que pueden inducir daño en el ADN y mutaciones en los genes, directamente a través de sus metabolitos, y/o indirectamente, mediante la síntesis de especies oxígeno reactivas (*reactive oxygen species*, ROS) (Cavalieri et al., 2000). Los radicales libres, como ROS, se encuentran involucrados en el proceso carcinogénico produciendo daño oxidativo en las

macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN). Este tema se encuentra ampliamente detallado en el subapartado 5.3.2 de este capítulo.

La determinación de los receptores esteroideos ha permitido clasificar los tumores mamarios, según su contenido receptor, en hormonodependientes (RE+ RP+) y hormonoindependientes (RE- RP-). También existen otros tumores que presentan interpretaciones controvertidas (RE+ RP- y RE- RP+). La mayoría de los tumores mamarios experimentales presentan ambos tipos de receptores y su contenido medio es mayor cuanto menor es la dosis de carcinógeno utilizada (Escrich, 1985; Escrich, 1990). En cáncer de mama humano, esta clasificación ha resultado de gran utilidad puesto que permite seleccionar a las pacientes candidatas de terapia hormonal. Además, el contenido en receptores, junto con otros factores pronóstico, ayuda a distinguir las pacientes con mayor riesgo de recurrencia. Al menos un 70% de las pacientes con cáncer de mama son clasificadas como RE+, por lo que el tratamiento más aplicado es el de interferir en la actividad estrogénica (Musgrove and Sutherland, 2009). Sin embargo, la determinación de los receptores no es suficiente para discernir la hormonodependencia funcional, como lo demuestra el hecho que entre un 20 y un 30% de los tumores con receptores no responden a la terapia endocrina (tumores hormonoinsensibles). Se han propuesto diferentes causas para esta resistencia al tratamiento antiestrogénico, como la pérdida de la funcionalidad de RE o mutaciones del mismo, alteraciones post-receptor, o producción alterada de factores autocrinos o paracrinos, entre otras (Iwase et al., 1998). La estructura, el patrón de expresión y las funciones de los receptores de estrógenos y progesterona se discutirán con más detalle en el subapartado 3.2.

Finalmente, al analizar el papel de los factores endocrinos en el cáncer de mama, debe considerarse el de las hormonas exógenas, y en particular el de los estrógenos. Existe una gran variedad de fuentes externas de estrógenos, también conocidos como xenostrogénos, los cuales son la clase más numerosa dentro de los disruptores endocrinos (Qin et al., 2011). Son sustancias químicas, exógenas al organismo, que presentan una actividad hormonal esteroidea (estrogénica) y cuando se ingieren o se absorben tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino. Pueden distinguirse: fitoestrógenos y micoestrógenos, como las isoflavonas,

lignanós y coumestanos; compuestos químicos sintéticos, entre los que se encuentran esteroides sintéticos y SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) como el tamoxifeno; y contaminantes medioambientales hormonalmente activos, como compuestos clorados (pesticidas, bifenilos policlorados y dioxinas/furanos), alquifenólicos (detergentes, antioxidantes en plásticos, espermicidas, cosméticos y champús) y bisfenol-A y/o derivados (policarbonatos, empastes dentales, resinas acrílicas y fungicidas) (Harvey and Darbre, 2004; Adlercreutz, 2003; Mitra et al., 2004; Brody and Rudel, 2003; Cabaravdic, 2006; Qin et al., 2011). En general, la estimación del riesgo de padecer cáncer de mama por la exposición a hormonas exógenas es difícil, ya que el período de latencia entre la exposición y la aparición de los síntomas de la enfermedad es largo. La genisteína, un fitoestrógeno presente en la soja, muestra un efecto quimiopreventivo en modelos experimentales con tumores mamarios inducidos químicamente. En humanos, se ha observado una asociación entre el aumento del consumo de soja y la disminución del riesgo de padecer cáncer de mama (Magee and Rowland, 2004). Los SERMs con actividad antiestrogénica constituyen la principal terapia endocrina utilizada actualmente. Dentro de este grupo, el tamoxifeno es un antagonista no esterooidal que actúa por inhibición competitiva con el estradiol en su unión a órganos diana, pero a muy altas concentraciones posee un efecto estimulador del cáncer de mama (Howell, 1993; Ibrahim and Hortobagyi, 1998). El tamoxifeno reduce la mortalidad y recurrencia del cáncer de mama en el 25 y 50% de los casos, respectivamente, en mujeres receptor de estrógenos positivo (RE+), aunque una tercera parte de éstas no responden a dicho tratamiento (Power and Thompson, 2003).

## **2.2. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS.**

La carcinogénesis es un proceso altamente complejo que resulta de la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas entre las que se hallan la inactivación de genes supresores y la activación de protooncogenes, de forma secuencial y/o simultánea (Bieche et al., 1994; Hanahan and Weinberg, 2000; Lee and Muller, 2010).

Las proteínas codificadas por los protooncogenes son componentes de las vías fisiológicas de transducción de señales mitogénicas: factores de crecimiento

(PDGF $\beta$ / v-sis), receptores de factores de crecimiento (EGFR/v-erbB), proteínas citoplasmáticas transductoras de señales (c-Ha-ras) y factores de transcripción (c-myc, c-fos, c-jun) (Lippman, 1991; Cantley et al., 1991). Estos genes pueden transformarse en oncogenes mediante un proceso de activación, que supone una ganancia de función en el sentido que las proteínas codificadas quedan permanentemente activadas, lejos de cualquier tipo de control, resultando en una estimulación del crecimiento excesiva o anormal (Hunter, 1991; Russo et al., 1993; Solanas, 2002). En cambio, los genes supresores de tumores inhiben el crecimiento celular, inducen a las células a la diferenciación terminal y/o inducen la muerte celular programada o apoptosis. Por ello, las mutaciones que eliminan las funciones de estos genes facilitan la formación de tumores al liberar a las células de las restricciones normales para proliferar (Cox et al., 1994). En este sentido, se habla de mutaciones con pérdida de función puesto que inactivan un componente represor de la proliferación celular (Van de Vijver and Nusse, 1991). En general, se requiere una nulicigosidad funcional para desencadenar el sobrecrecimiento celular tumoral. Ello significa que mientras exista una copia normal del gen existe función supresora (heterocigoto para la función) y que, en cambio, la mutación de ambos alelos (simultánea o por pérdida de heterocigosidad) supone la pérdida de dicha función (Sager, 1989). En algunos casos, la identificación de los genes supresores de tumores, como el gen del retinoblastoma (Rb) y el gen p53, ha ido ligada al estudio de los cánceres familiares donde la predisposición a padecer diferentes tipos de neoplasia se hereda como un típico carácter mendeliano autosómico (Hartwell, 1992).

Las alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de éstos y, probablemente, otros genes implicados en procesos tan esenciales para la célula como la proliferación, la diferenciación o la apoptosis se hallan en la base de los mecanismos moleculares del cáncer. Hanahan D y Weinberg RA (Hanahan and Weinberg, 2000) en el año 2000 describieron una serie de capacidades esenciales que compartían las células tumorales, y en una revisión posterior añadieron características nuevas de la célula tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). En total se han descrito 8 capacidades esenciales: 1) autosuficiencia en cuanto a la necesidad de factores de crecimiento; 2) insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento; 3)

## Introducción

evasión de la muerte programada (apoptosis); 4) potencial ilimitado de replicación; 5) evasión del sistema inmune; 6) reprogramación del metabolismo energético tumoral; 7) angiogénesis sostenida; 8) invasión de tejidos y metástasis. Además, se ha atribuido dos capacidades facilitadoras de la supervivencia de las células tumorales, como son la inestabilidad genómica y mutación, y la promoción de la inflamación tumoral. La adquisición de todas estas capacidades implica alteraciones de los genes anteriormente mencionados.

La primera de las características mencionadas hace referencia al hecho de que la célula tumoral, en comparación con la célula normal, muestra una reducida dependencia de las señales exógenas estimuladoras del crecimiento. Esta capacidad incluye varios mecanismos, entre los que se encuentran la adquisición de la habilidad de sintetizar factores de crecimiento (como PDGF y TGF $\alpha$  (*Transforming growth factor*  $\alpha$ )) la alteración de la expresión y/o activación de receptores de factores de crecimiento, como EGFR y ErbB2; la alteración de algunos de los componentes de las vías de señalización intracelular mitogénica, como la vía Sos-Ras-Raf-ERK1/2 -en el 30% de los tumores humanos las proteínas Ras se encuentran estructuralmente alteradas, lo que genera un flujo de señales mitogénicas hacia la célula sin necesidad de estimulación de sus reguladores *upstream*; o la inducción de la síntesis de factores de crecimiento por las células vecinas (Lippman, 1991; Cantley et al., 1991; Walker and Lockyer, 2004). Otra de las particularidades de la célula tumoral es la capacidad de evadirse de las señales antiproliferativas que en un tejido normal mantienen las células quiescentes y la homeostasis tisular. Algunas de estas señales están asociadas con componentes responsables del paso de las células por la fase G1 del ciclo celular, como la proteína Rb (pRb) fosforilada, p107 y p130; y con la diferenciación, como el factor de transcripción c-myc, APC/ $\beta$ -Catenina, etc. (Hanahan and Weinberg, 2000). Pero el cáncer no aparece necesariamente como resultado de un aumento de la tasa de proliferación celular, sino que su desarrollo depende del balance crítico entre este proceso y el de apoptosis. Por tanto, la desregulación de la proliferación junto con la reducción de la apoptosis serían los fenómenos responsables de crear un "escenario" que sería necesario y a la vez suficiente para el desarrollo del cáncer (Evan and Vousden, 2001; Green and Evan, 2002).

La adquisición de las capacidades de autonomía, insensibilidad a factores antiproliferativos y resistencia a apoptosis conduce a la célula a un crecimiento independiente del medio. Pero para un crecimiento ilimitado es necesaria la evasión de la senescencia y la inmortalización, a través de la incapacitación de las proteínas supresoras de tumores pRb y p53, y el mantenimiento de los telómeros (Hanahan and Weinberg, 2000). Las mutaciones en el gen p53 representan uno de los cambios genéticos más comunes identificados en el cáncer de mama. Además, las alteraciones de esta proteína están asociadas con una mayor agresividad de los tumores y con un peor pronóstico (Harris, 1996; Keen and Davidson, 2003; Freed-Pastor and Prives, 2012). 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 (Hanahan and Weinberg, 2011; Artandi and DePinho, 2010).

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 (Nelson, 2008; Ferrone and Dranoff, 2010; Bindea et al., 2010). De acuerdo con esto, los tumores que terminan por aparecer, obviarían la vigilancia por parte del sistema inmunitario o bien evitarían ser eliminados por él de distintas maneras, como sería paralizar los linfocitos T CD8+ y las células NK (*Natural Killer*) o secretando factores inmunosupresores como el TGF $\beta$  (Yang et al., 2010; Shields et al., 2010). 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 (Grivnickov et al., 2010; DeNardo et al., 2010; Qian and Pollard, 2010; Karnoub and Weinberg, 2006).

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 (*Glucose transporter 1*) (DeBerardinis et al., 2008; Hsu and Sabatini, 2008; Jones and Thompson, 2009). De igual manera, el tumor necesita crear vasos sanguíneos (angiogénesis) para recibir oxígeno y nutrientes. Los tumores alteran la transcripción génica favoreciendo la expresión de factores pro-angiogénicos en detrimento de los anti-angiogénicos, por ejemplo incrementando la expresión de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) y/o FGFs (*Fibroblast Growth Factors*), o disminuyendo la expresión de inhibidores endógenos como la trombospondina-1 y el interferon- $\beta$  (Hanahan and Weinberg, 2000; Parker et al., 2004). Finalmente, los tumores deben adquirir la capacidad de invadir otros tejidos y metastatizar, y para ello deben alterar la expresión/función de moléculas de adhesión célula-célula y célula-substrato, como E-Cadherina,  $\beta$ -Catenina, N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) e Integrinas, y proteasas de superficie degradadoras de la matriz extracelular (Hanahan and Weinberg, 2000; Guo and Giancotti, 2004).

Tal y como se ha comentado, las alteraciones de todos los tipos de genes mencionados constituyen la base de la transformación neoplásica, permitiendo la adquisición de las capacidades de la célula tumoral. La acumulación de mutaciones ha sido considerada clásicamente el mecanismo de alteración de estos genes. Sin embargo, este paradigma ha sido extendido para incluir la disrupción epigenética como uno de los mecanismos principales de transformación maligna. La alteración epigenética más estudiada en cáncer en general, y en el de mama en particular, son las modificaciones en los patrones de metilación del ADN. La hipometilación global, junto con la hipermetilación de genes específicos, es una característica común de las células tumorales (Jovanovic et al., 2010). La pérdida global de metilación ha sido asociada con la sobreexpresión de protooncogenes, la predisposición a la inestabilidad cromosómica y la aneuploidía (Esteller, 2008). Asimismo, la hipermetilación de promotores de genes está asociada a la inactivación de genes implicados en vías de reparación del ADN, control del ciclo celular o apoptosis. Se

han descrito numerosos genes hipermetilados en tumores de mama humanos implicados en la adquisición de las características de la célula tumoral anteriormente comentados (Martens et al., 2005; Widschwendter et al., 2004). Otros mecanismos epigenéticos están frecuentemente desregulados en diversos tipos de cáncer, tales como cambios aberrantes en la modificación de histonas, expresión desregulada de microARNs o la sobreexpresión de proteínas del grupo *polycomb* que evitan la unión de la maquinaria de transcripción a las secuencias promotoras del ADN, (Esteller, 2008; Widschwendter and Jones, 2002; Fiegl et al., 2005).

Por último, y en lo que respecta al cáncer de mama hereditario, éste constituye únicamente el 5-10% del total de cánceres mamarios (Nathanson et al., 2001). Se han descrito diversos genes que están relacionados con la susceptibilidad de un individuo de padecer este tipo de cáncer, señalando BRCA1 -*Breast Cancer 1*- y BRCA2 -*Breast Cancer 2*- como los principalmente implicados (Miki et al., 1994; Wooster and Stratton, 1995; Lynch et al., 2012). La mutación de BRCA1 en la línea germinal se ha identificado en el 15-20% de pacientes con historia familiar de cáncer de mama y en el 60-80% con historia familiar de cáncer de mama y ovario. BRCA1 codifica una proteína nuclear que funciona como un coactivador transcripcional. Ésta une a BRCA2, p53, RAD51 y otras proteínas involucradas en el ciclo celular y de respuesta al daño en el ADN. Células sin BRCA1 funcional no se paran en G2 después de un daño en el ADN y son deficientes en la reparación acoplada a la transcripción. BRCA1 es parte del complejo RAD50-MRE11-p95, componente esencial de la reparación mediada por recombinación de las roturas del ADN de doble cadena (Nathanson et al., 2001; Narod and Foulkes, 2004). 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 (Wooster and Stratton, 1995; Gayther et al., 1995). Las mutaciones en BRCA2 se caracterizan por su asociación con un elevado riesgo de cáncer mamario en hombres (Wooster and Stratton, 1995; Lynch et al., 2012). El hecho de que las mutaciones en estos dos genes confieran en los hombres grados diferentes de riesgo de padecer cáncer de mama hace pensar en que puedan estar regulados por hormonas sexuales (Wooster and Stratton, 1995). BRCA1 puede interactuar y actuar como coactivador del promotor del receptor de andrógenos, lo que explicaría porque la

variación alélica en el receptor de andrógenos afectaría a la penetrancia del cáncer de mama en portadores de la mutación en BRCA1. BRCA2 estaría involucrada en la respuesta mediada por recombinación de la rotura de doble cadena de ADN y el mantenimiento de la integridad cromosómica. Asimismo, desempeña un papel en la segregación de los cromosomas (Nathanson et al., 2001; Keen and Davidson, 2003; Narod and Foulkes, 2004). De todas formas, no todos los casos hereditarios se explican por una alteración en alguno de estos genes, por lo que se cree que en el futuro se aislarán nuevos genes relacionados con esta patología.

### **2.3. FACTORES AMBIENTALES.**

La incidencia del cáncer de mama presenta grandes diferencias geográficas (Borrás, 1992; Moreno, 2001; Bray et al., 2004). Además, la tasa en poblaciones de baja incidencia que viajan a países de gran incidencia varía hasta asemejarse a las de la nueva región en 2-3 generaciones. Todo ello sugiere que además de los factores genéticos y endocrinos deben existir factores medioambientales y de estilo de vida implicados en el desarrollo del cáncer de mama (Willett, 2001b; Willett, 2001a; Rock, 2003; Bray et al., 2004). De todos ellos, los nutricionales se consideran de gran trascendencia debido, en primer lugar, a la continua exposición o deficiencia a la cual puede estar sometida la población por sus hábitos alimentarios y estilo de vida, y en segundo lugar, a la posibilidad de adoptar medidas preventivas basadas en este tipo de factores (WCRF/AICR, 2007).

Entre los numerosos componentes de la dieta que han sido relacionados con el cáncer de mama, los lípidos son de los más relevantes. En este sentido, existen numerosos estudios experimentales y epidemiológicos que han puesto de manifiesto la relación lípidos de la dieta y cáncer de mama, aunque algunos resultados, epidemiológicos principalmente, son controvertidos. En el caso de los estudios ecológicos por países, se ha hallado una asociación positiva entre el consumo de grasa *per cápita* 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 metaanálisis, 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 (Carroll and Khor, 1975; Armstrong and Doll, 1975; Lee and Lin, 2000; Willett, 1999). 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 (Schulz et al., 2008). Las discrepancias entre los distintos estudios podrían ser debidas a diversos motivos metodológicos, como el distinto número de efectivos y, principalmente, la limitación y/o sesgo de las herramientas de evaluación de la exposición dietética, las cuales alterarían la calidad de los datos recogidos en las poblaciones (Willett, 1998; Bingham et al., 2003). Resultados obtenidos por la WHI (*Woman's Health Initiative*), el mayor ensayo de intervención dietética realizado recientemente, han mostrado una reducción, cercana a la significación, de la incidencia del cáncer de mama en los grupos que recibieron una dieta con baja cantidad de grasas en comparación al grupo control (Prentice et al., 2006). Sin embargo, está en discusión cómo estos estudios pueden distinguir entre los efectos producidos por una reducción de las grasas en la dieta y los efectos derivados de un aumento de la ingesta de frutas y verduras. Del mismo modo, continúa abierto el debate sobre cómo elucidar el mecanismo por el cual la reducción de las grasas en la dieta en edades tempranas puede reducir el riesgo de sufrir cáncer de mama décadas después (Lee and Lin, 2000; Owen et al., 2004; Mayne, 2006). Por tanto, actualmente la asociación entre lípidos de la dieta y cáncer de mama en las poblaciones humanas permanece todavía sin resolver.

Por otra parte, los estudios experimentales han mostrado claramente una asociación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. En este sentido, animales alimentados con dieta con elevada cantidad de grasa presentan mayor incidencia tumoral, más allá de la elevada ingesta calórica y del peso corporal. Asimismo, se ha descrito que los efectos de los lípidos de la dieta dependen no sólo de la cantidad sino también del tipo de grasa, el momento de su administración y el estado de diferenciación de la glándula mamaria (Fay et al., 1997; Hilakivi-Clarke,

2007; MacLennan and Ma, 2010). En general, las dietas hiperlipídicas son fundamentalmente promotoras del cáncer de mama, aunque dietas con una misma cantidad de energía y contenido graso total difieren en su capacidad estimuladora según su composición en ácidos grasos (Rose et al., 1993; Kaput and Rodriguez, 2004). Además, parece existir un requerimiento mínimo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a partir del cual el efecto de la grasa dependería de la cantidad total de lípidos de la dieta. Concretamente, por encima del 4-5% de PUFA, respecto al total de calorías, el rendimiento de la carcinogénesis por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) incrementa proporcionalmente a la cantidad de grasa total de la dieta, independientemente de que ésta sea de origen animal o vegetal (Carroll, 1992; Bartsch et al., 1999). En cuanto al efecto de las calorías, se ha demostrado una asociación positiva entre el aporte calórico de las dietas y las tasas de mortalidad por cáncer. Además, la restricción calórica tiene un efecto inhibitorio indiscriminado sobre la carcinogénesis, lo que sugiere un mecanismo de acción inespecífico (Kritchevsky, 1999). Por tanto, una parte del efecto estimulador de las dietas ricas en grasas podría ser atribuido a su elevado contenido en calorías, aunque también existen mecanismos específicos por los cuales los lípidos de la dieta influyen en el cáncer de mama (Freedman et al., 1990). Un argumento que apoya esta conclusión es el hecho de que sólo ciertos tipos de tumores se estimulan por las dietas ricas en grasas. El diferente efecto de los distintos tipos de lípidos así como los mecanismos por los cuales modulan la carcinogénesis serán ampliamente discutidos en el apartado D de este capítulo.

Aunque otros factores nutricionales han sido relacionados en estudios experimentales con el cáncer de mama, epidemiológicamente los resultados no son totalmente concluyentes (WCRF/AICR, 2007). Así, se ha sugerido una posible disminución del riesgo de la carcinogénesis mamaria por efecto de proteínas de origen vegetal, fibra, vitaminas (A, C, carotenoides), licopeno, glucosinolatos e indoles, isoflavonas y lignanos, Se, o metilxantinas, mientras que algunos trabajos han indicado un aumento del riesgo por efecto de dietas con elevadas cantidades de proteína animal (caseína) o azúcares simples (Divisi et al., 2006).

Existen datos epidemiológicos que han asociado otros factores ambientales y de estilo de vida, además de los nutricionales, con el riesgo a desarrollar cáncer de

mama. La obesidad es considerada un factor de riesgo independiente en mujeres post-menopáusicas, mientras que se ha sugerido que podría disminuir dicho riesgo en mujeres pre-menopáusicas. Estudios caso-control también han sugerido una asociación entre el peso en el momento del nacimiento y el riesgo de cáncer de mama (WCRF/AICR, 2007). Por otro lado, diferentes estudios observacionales han mostrado una asociación positiva entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de mama (WCRF/AICR, 2007). En cuanto al consumo de tabaco, éste ha sido claramente asociado con otros tipos de cáncer, pero la relación con el de mama ha mostrado resultados inconsistentes. No obstante, las evidencias apuntan a un aumento del riesgo tras un largo período de hábito tabáquico, inicio antes del primer embarazo a término, y en fumadores pasivos (Terry and Rohan, 2002). La actividad física, por otra parte, ha mostrado una asociación inversa con el riesgo de cáncer de mama, sobretodo en mujeres post-menopáusicas (WCRF/AICR, 2007).

Por último, se ha sugerido que otros factores tales como radiaciones ionizantes, metales como el cadmio, xenoestrógenos y otros disruptores endocrinos (dietilestilbestrol, bisfenol A, parabenos, alquilfenoles, dioxinas, pesticidas), y diversos compuestos químicos (solventes orgánicos, aminas aromáticas, benceno, PVC), podrían estar relacionados con el aumento en la incidencia del cáncer de mama observado en las últimas décadas (Gray et al., 2009).

### **3. LÍPIDOS DE LA DIETA Y CÁNCER DE MAMA**

Tal como ya se ha citado, numerosos estudios epidemiológicos y, fundamentalmente, experimentales, han puesto de manifiesto la relación entre los lípidos de la dieta y el cáncer de mama. 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 (Ip, 1987; Bartsch et al., 1999; Solanas, 2000; Stoll, 2002). Es de destacar el ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3n-6) que supone una excepción dentro de esta familia, ya que posee propiedades antiproliferativas (Begin et al., 1988; Kenny et al., 2001). Además, el ácido linoleico conjugado (CLA), término en el que se engloban diversos isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, y que está presente en la carne y en los productos

lácteos derivados de rumiantes, podría tener un efecto inhibitor del cáncer de mama (Ip et al., 1996; Ip, 1997). Además, éste presenta propiedades antidiabéticas, anticancerígenas y antioxidantes (Ip et al., 2003; Khan and Vanden Heuvel, 2003). Por otro lado, los PUFA de la familia n-3, fundamentalmente el ácido  $\alpha$ -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 (Ip et al., 1986; Bartsch et al., 1999; Woutersen et al., 1999; Stoll, 2002; Tavani et al., 2003). 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 (Kritchevsky et al., 1984; Ip et al., 1986; Ip, 1997). Finalmente, el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), fundamentalmente el ácido oleico (18:1n-9), presente en elevadas cantidades en el aceite de oliva, es de especial interés. Aunque cada vez existen más evidencias de un posible efecto quimiopreventivo del aceite de oliva virgen, experimentalmente existen resultados contradictorios, Así, se ha observado desde un efecto no promotor, un débil efecto promotor, a un efecto protector del cáncer de mama (Bartsch et al., 1999; Escrich, 2006; Soto-Guzman et al., 2010).

La Dieta Mediterránea, caracterizada por el elevado consumo de aceite de oliva, se asocia a una menor incidencia de ciertos cánceres, incluyendo el de mama, así como de enfermedades cardiovasculares (Owen et al., 2000b; Gallus et al., 2004). La Dieta Mediterránea incluye la variedad de patrones dietéticos de las distintas regiones del Mediterráneo y se identifica por el abundante consumo de productos de origen vegetal (frutas, vegetales, cereales y frutos secos), productos frescos, pescado, y el ya mencionado aceite de oliva (Willett et al., 1995). 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 (Hashim

et al., 2005; Owen et al., 2000a). 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 (Bougnoux et al., 2006; Pérez-Jiménez, 2003; Visioli and Galli, 2002). 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. Por lo tanto, la relación entre consumo de aceite de oliva y cáncer de mama constituye un tema controvertido que podría tener importantes repercusiones en la salud humana, especialmente entre la población femenina (Martin-Moreno, 2000).

La influencia de los lípidos sobre la carcinogénesis mamaria parece ejercerse fundamentalmente durante la etapa de la promoción. Sin embargo, también existen evidencias de su posible papel durante la iniciación de la carcinogénesis, actuando como co-carcinógenos al facilitar la acción genotóxica de diversos agentes o como agentes protectores, dificultándola. Así, los lípidos podrían alterar la estructura de la cromatina y afectar la accesibilidad de carcinógenos, la reparación del ADN y/o el acceso de la maquinaria de transcripción a determinados genes (Ronai et al., 1991). En este sentido, estudios *in vitro* sugieren que las interacciones electroestáticas entre histonas y ADN pueden verse afectadas por interacciones con membranas nucleares que contienen fosfolípidos ácidos y esfingosina, modulando así la función de la maquinaria genética de replicación, transcripción y reparación del ADN (Sekimizu, 1994; Kinnunen et al., 1994). Además, la presencia de fosfolípidos,

fundamentalmente esfingomielina y fosfatidilserina, plasmalógenos y colesterol, como componentes de la cromatina, está actualmente bien documentada, y algunos estudios sugieren que estos lípidos nucleares podrían jugar papeles importantes en la regulación transcripcional que refleja el estado metabólico o de desarrollo de la célula (Albi and Viola Magni, 2004). Por otro lado, en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida en la rata con 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina (PhIP), se ha observado un aumento de los aductos carcinógeno-ADN en las células epiteliales mamarias de los animales alimentados con dieta hiperlipídica n-6 (Snyderwine et al., 1998). Además, la administración de diferentes tipos de dieta en las etapas previas a la hepatocarcinogénesis inducida con azoximetano en rata también sugiere un efecto sobre la iniciación de los PUFA n-6, pero no de los lípidos saturados (Rahman et al., 2001). En cambio, la exposición a CLA durante el período de maduración de la glándula mamaria en rata se ha demostrado que proporciona un efecto protector en la iniciación de la carcinogénesis (Thompson et al., 1997). Otros aspectos a considerar son la posible acción carcinogénica iniciadora de las sustancias acompañantes de las grasas, como contaminantes alimentarios, aditivos y hormonas, así como la posibilidad de que los lípidos pudieran activar determinadas sustancias exógenas carcinogénicas o modular la producción endógena de sustancias capaces de dañar el ADN (Rouse et al., 1982; King, 1983; Nemoto, 1986).

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

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

La fertilidad y la maduración sexual son factores de riesgo del cáncer de mama. Así, la nuliparidad (no tener descendencia) o un primer embarazo en edad avanzada

constituyen factores de riesgo debido a que en estos casos la glándula mamaria no alcanzaría su máxima diferenciación, o bien la alcanzaría muy tarde. El avance de la pubertad (menarquia precoz) y la menopausia tardía también son factores de riesgo ya que aumentan el número total de ciclos reproductivos en los que la glándula mamaria sufre un proceso de crecimiento e involución, lo cual influye en su susceptibilidad a la carcinogénesis. Además, en la menarquia precoz se induce una proliferación temprana de las células mamarias por exposición a elevados niveles hormonales (de Waard and Thijssen, 2005; WCRF/AICR, 2007; Rosner et al., 1994; Rudel et al., 2011; Parsa and Parsa, 2009).

La pubertad está influida por factores hormonales, nutricionales y energéticos (da Silva Faria et al., 2004). El desarrollo puberal se origina en el momento que el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal es completamente maduro (Halasz et al., 1988). La GnRH es la responsable, de dicho eje (Maeda et al., 2010; Santoro et al., 1986; Kelch et al., 1985; Belchetz et al., 1978; Terasawa et al., 2010). Las etapas iniciales de la maduración sexual están mediadas por la aceleración de la secreción pulsátil de dicha hormona hipotalámica (Sisk et al., 2001), siendo dicha secreción resultado del equilibrio dinámico entre señales hipotalámicas excitadoras e inhibitoras (Ojeda et al., 2006; Terasawa et al., 2010; Ojeda et al., 2008; Christian and Moenter, 2010). Las neuronas GnRH están controladas por el neuropéptido Kisspeptina, que a través de su receptor resulta clave en diversos aspectos de la maduración y la reproducción (Pinilla et al., 2012; Lehman et al., 2010; Navarro et al., 2009; Wakabayashi et al., 2010).

Para que se inicie la pubertad y la reproducción se requiere un depósito de energía suficiente y un estado metabólico adecuado (Frisch et al., 1975; Mann and Plant, 2002; Cheung et al., 2001), 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 (Roa et al., 2008). De hecho, el tejido adiposo está en constante comunicación con otros centros reguladores de la ingesta del cerebro (Evans et al., 2004). 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 (Wang et al., 2007). Entre dichas adipoquinas se

encuentra la Adiponectina y la Leptina (Jeong et al., 2011; Lorincz and Sukumar, 2006; Ahima, 2006).

Leptina y Adiponectina regulan la secreción de GnRH (Pinilla et al., 2012). La Leptina, es producida principalmente en tejido adiposo y, en menor medida, en células epiteliales de la glándula mamaria, ovarios, estómago y placenta (Jeong et al., 2011; Jarde et al., 2008). Sus niveles circulantes se correlacionan positivamente con el peso corporal y la cantidad de grasa (Somasundar et al., 2004; Michalakis et al., 2013). 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 (Mann and Plant, 2002; Cheung et al., 2001; Kratz et al., 2002; Jarde et al., 2008). Dicha hormona actuaría como un importante regulador del sistema hipotalámico de Kisspeptina y, por tanto, de la funcionalidad del eje reproductivo (Aubert et al., 1998; Roa et al., 2008). La expresión y secreción de la Leptina están reguladas, entre otros factores, por las hormonas esteroideas (Messinis et al., 2001; Shin et al., 2007). Habiéndose descrito una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de estradiol, la cantidad de grasa corporal y los niveles circulantes de Leptina (Paolisso et al., 1998). La Adiponectina es sintetizada principalmente en el tejido adiposo y realiza sus funciones mediante la unión a su receptor AdipoR (Jarde et al., 2011; Jeong et al., 2011; Chandran et al., 2003). Está involucrada en el metabolismo lipídico y el mantenimiento de la energía homeostática, de manera que sus niveles están inversamente correlacionados con el acúmulo central de grasa (Ishikawa et al., 2004; Arita et al., 2012; Weyer et al., 2001; Mantzoros et al., 2004; Michalakis et al., 2013). Ambas adipoquinas se han relacionado con otras funciones. La Leptina parece tener un papel en el desarrollo epitelial de la glándula mamaria promoviendo la proliferación celular (Hu et al., 2002), y se ha descrito la expresión de su receptor en diversos tipos de tumores incluidos los de mama (Ishikawa et al., 2004; Knerr et al., 2001; Wang et al., 2004). La Adiponectina parece realizar una función opuesta, inhibiendo la proliferación celular. Por este motivo, los niveles de ambas adipoquinas y sus respectivos receptores podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis mamaria (Jarde et al., 2011; Jeong et al., 2011; Grossmann et al., 2008).

Existen evidencias de la influencia de los lípidos de la dieta en el crecimiento y maduración sexual. Una dieta con elevada cantidad de grasas puede producir el adelantamiento de la pubertad (de Waard and Thijssen, 2005; WCRF/AICR, 2007; Rosner et al., 1994; Rudel et al., 2011; Gereltsetseg et al., 2012). Este efecto, no obstante, parece depender del tipo de grasa consumida (Fernandez-Quintela et al., 2007). El mecanismo de este efecto diferencial podría estar directamente relacionado con las características de los ácidos grasos, como su estructura, longitud de la cadena o grado de insaturación (Moussavi et al., 2008). 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 (Romaguera et al., 2010; Martinez-Gonzalez et al., 2012). 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) o N-aciletanolamida (Borrelli and Izzo, 2009; Lo Verme et al., 2005). Dicha molécula pertenece a una familia de moléculas lipídicas señalizadoras que se localizan 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, a partir de fosfatidilcolina cuando las células son estimuladas por agentes despolarizantes, neurotransmisores y hormonas (Borrelli and Izzo, 2009; Rodriguez de Fonseca et al., 2001; Thabuis et al., 2008; Serrano et al., 2011). La OEA parece jugar un papel importante en el control central y periférico de la ingesta, de forma integrada con el control nervioso y hormonal de la saciedad (Thabuis et al., 2008; Gonzalez-Yanes et al., 2005; Fu et al., 2005). El grupo investigador ha demostrado que una dieta rica en aceite de oliva podría aumentar los niveles de OEA, protegiendo así de la obesidad en comparación con una dieta rica en aceite de maíz (Sospedra et al., 2015).

### **3.2. 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

## *Introducción*

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 (Dickson et al., 1990).

Los lípidos de la dieta podrían estar implicados en la modificación de la disponibilidad de los estrógenos y, por lo tanto, estarían influyendo el desarrollo del cáncer de mama ya que es una patología hormonodependiente. Así, la alteración del metabolismo de los estrógenos es un posible mecanismo a través del cual los lípidos de la dieta podrían modificar el proceso carcinogénico mamario. Una ingesta elevada de grasas puede aumentar el tejido adiposo corporal y mamario, y, consecuentemente, también aumentaría la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, secretados por la glándula adrenal, a través de la enzima aromatasa P450. Esta enzima ha sido hallada en tejido mamario adiposo y tumoral (Deslypere et al., 1985; Miller, 2006). En el grupo de mujeres post-menopáusicas el tejido adiposo se convierte en la principal fuente de estrógenos procedentes de dicha actividad aromatasa (Keen and Davidson, 2003). Por lo tanto, las mayores tasas de cáncer de mama observadas en mujeres post-menopáusicas y obesas (Key et al., 2003; Lahmann et al., 2004) podrían estar asociadas con un aumento de los niveles de estrógenos (Boyapati et al., 2004).

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  $17\beta$ -deshidrogenasa e impidiendo, de esta forma, el paso de estradiol a estrona (Martin et al., 1986; Wynder et al., 1997; Bartsch et al., 1999). Además, un incremento en el consumo de EPA, a través de la ingesta de pescado, disminuye la formación de prostaglandina E2 (PGE2), un metabolito del ácido araquidónico que estimula la actividad de la aromatasa P450, lo cual disminuiría la producción local de estrógenos y el crecimiento estimulado por éstos (Larsson et al., 2004). 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 (Hill et al., 1971). 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 (Rao et al., 1998). 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. Además, los lignanos inhiben la proliferación inducida por estradiol de células de cáncer mamario humano MCF-7, y estimulan la síntesis de la globulina transportadora de hormonas sexuales, con el subsecuente incremento del estradiol total. Sin embargo, los niveles de estradiol libre se reequilibran para mantener la homeostasis (Owen et al., 2000b).

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 (Welsch and Aylsworth, 1983; Sylvester et al., 1986; Ip and Ip, 1981; Escrich, 1990; Mizukami et al., 1992).

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 (Bartsch et al., 1999).

Por otra parte, el efecto de los lípidos de la dieta podría estar relacionado con los receptores esteroideos. En ratas, una dieta rica en PUFA n-6 aumentó el nivel de RE en la glándula mamaria de animales vírgenes. En ratas gestantes, dicha dieta aumentó los niveles de RE, sin embargo, en la descendencia los niveles de RE en glándula mamaria disminuyeron significativamente, en asociación con una disminución de la diferenciación epitelial a favor de un mayor número de estructuras dianas de la transformación maligna (Hilakivi-Clarke et al., 1998). 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 (Ip and Ip, 1981; Noguchi et al., 1991). Asimismo, se ha postulado que la obesidad afectaría el desarrollo del cáncer de mama en etapas tempranas en la tumorigénesis sin alterar el estado de receptores de estrógenos en el tumor (Ray et al., 2007). Por tanto, no

hay datos concluyentes sobre la influencia de los lípidos de la dieta y los receptores de esteroides gonadales (Ip and Ip, 1981; Mizukami et al., 1992).

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 (Sylvester et al., 1986; Cohen, 1981; Lomeo et al., 1986).

### **3.3. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR.**

La composición en lípidos polares (fosfolípidos, esfingomielina y cardiolipina en mitocondria) y el contenido en colesterol de las membranas celulares están finamente regulados por las células, y pueden variar en función de los lípidos que habitualmente se ingieren (Cave and Jurkowski, 1984; Spector and Burns, 1987; Clandinin et al., 1991; Cave, 1997). Las membranas celulares parecen mantener relativamente constante sus niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados dentro de un amplio rango de variación de estos ácidos grasos en la dieta. 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 (Hulbert et al., 2005; Schmitz and Ecker, 2008). 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 (Jump, 2004). Así, elevadas cantidades de PUFA n-6 en las membranas se han asociado a una mayor tasa de proliferación celular (Welsch, 1987; Stoll, 2002).

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 (Clandinin et al., 1991; Merrill and Schroeder, 1993). 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 (Spector and Burns, 1987). 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

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> dependiente y del receptor de insulina (Gidwitz et al., 1980; Solomonson et al., 1976; Lomeo et al., 1986; Clandinin et al., 1991). En todos estos casos, los PUFA parecen mostrar un mayor efecto que los MUFA (Hulbert et al., 2005; Hulbert and Else, 2000). 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 (Burn, 1988). Las interacciones con lípidos de membrana pueden afectar su ensamblaje, plegamiento u organización topológica y, por lo tanto, su función. Proteínas implicadas en la transducción de señales generadas en las membranas, como las GTPasas Ras, fosfolipasa citidiltransferasa, PKC (Proteína quinasa C) y PLC (Fosfolipasa C), son comúnmente reguladas por anfitropismo (Dowhan et al., 2004). Además, varias proteínas de la matriz extracelular y del citoesqueleto, como vinculina,  $\alpha$ -actinina, profilina y gelsolina, pueden interactuar con fosfolípidos de membrana, regulando procesos fundamentales como la división, migración, adhesión celular, cambio de forma o interacciones célula-célula (Niggli and Burger, 1987; Grimard et al., 1993).

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* (Rajendran and Simons, 2005; Simons and Vaz, 2004; Yaqoob, 2009). Dichos dominios tienen una composición característica, tanto de lípidos como de proteínas, de manera que cambios en su organización pueden conducir a una desregulación de la propia célula. Los *lipid raft* son dominios pequeños (10-200 nm) y representan el 10-15% del área de la membrana plasmática (Freeman and Solomon, 2004). Se caracterizan por su composición lipídica rica en colesterol, esfingolípidos y lípidos que contienen cadenas de ácidos grasos saturados (Chapkin et al., 2008; Mantovani, 2009). Según su composición, pueden clasificarse en *Chol-Rafts* y *Cer-Rafts*. Los *Chol-Rafts* están enriquecidos en colesterol, esfingomielina y gangliósidos, mientras que los *Cer-Rafts* son ricos en ceramida y esfingomielina (Patra, 2008). Los *lipid raft* citados en la literatura corresponden a los *Chol-Rafts*. Además, según su morfología, también pueden distinguirse dos variedades 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 (Cav1)

## Introducción

(Freeman and Solomon, 2004; Razani et al., 2002; Rajendran and Simons, 2005). Los *flat rafts* son estructuras no caveolares que sin embargo comparten una composición de lípidos y proteínas muy similares a las de las caveolas. Recientemente, se han determinado las diferencias funcionales entre ambos tipos de estructuras debidas a la diferente composición en proteínas (Yao et al., 2009). Tanto los *flat rafts* como las caveolas contienen la proteína Flotilina, cuya función principal es de andamiaje, en ocasiones formando complejos heterodiméricos junto con caveolina (Bickel et al., 1997).

Los *lipid rafts* están implicados en señalización celular, endocitosis, transcitosis, tráfico de colesterol y adhesión (Jump, 2004; Stulnig, 2003; Brown and London, 2000; Freeman and Solomon, 2004; Razani et al., 2002; Rajendran and Simons, 2005; Simons and Vaz, 2004), lo que explicaría su papel en diversos tipos de patologías, entre ellas el cáncer (Ma et al., 2004b; Michel and Bakovic, 2007). Su función 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 (Simons and Ikonen, 1997). En este sentido, se ha descrito la localización de algunos de los componentes de la vía de señalización intracelular mediada por la proteína p21Ras en estos microdominios de membrana (Prior and Hancock, 2001; Mineo et al., 1996; Zhuang et al., 2002; Ma et al., 2004a). En colon de ratones, se ha observado una disminución de la activación de la proteína Ha-Ras en los microdominios lipídicos por efecto de los PUFA n-3 de la dieta, en comparación con los PUFA n-6, asociada con cambios en la composición lipídica y proteica de las caveolas. La causa de la supresión de la vía de señalización de Ras sería (altera su localización) un desplazamiento de Ha-ras en los microdominios lipídicos por efecto de dichos lípidos (Ma et al., 2004a; Chapkin et al., 2008). Además, en el modelo de cáncer de colon inducido en la rata 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 polimitoilación de la proteína (Davidson et al., 1999). Otros autores han demostrado que los PUFA n-3, en comparación con los PUFA n-6, disminuyen la relación Ras membrana-citosol (Singh et al., 1997). 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 (Visioli, 1998; Rao et al., 1998; Smith et al., 1998; Newmark, 1999; Kris-Etherton et al., 1999). Estudios recientes del grupo investigador han demostrado que los lípidos de la dieta modifican diferencial y específicamente la composición de la membrana de las células tumorales mamarias. Así, una dieta rica en aceite de maíz enriqueció la membrana en PUFA n-6 y en colesterol, mientras que una dieta rica en aceite de oliva aumentó los niveles de MUFA n-9. Esta misma dieta provocó un aumento de la ratio ceramida/esfingomielinina y de CD95 así como una disminución de los niveles de Cav1 en caveolas. Estos resultados estuvieron en línea con la disminución de la actividad de p21Ras, la *downregulación* de la vía Akt y la inducción de la apoptosis previamente demostrada por efecto de la dieta de aceite de oliva en los tumores mamarios experimentales (Solanas et al., 2010).

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 (Clandinin et al., 1991; Tomassoni et al., 1999).

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 (Aylsworth et al., 1984; Aylsworth et al., 1987; Holder et al., 1993).

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

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

dentro de la cascada de señalización intracelular (Exton, 1994; Jump, 2004). Entre ellas, inositol-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres (*free fatty acids*, FFA) que activan PKC, y ácido fosfatídico (PA) que, además, puede ser metabolizado a DAG. Asimismo, PA actuaría, como coactivador de la vía de MAPK junto con p21Ras (Haeffner, 1993; Graber et al., 1994; Daniel et al., 1999; Uchida et al., 1997). 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 (Escrich et al., 2001). Se ha comprobado que algunas dietas hiperlipídicas incrementan el nivel de DAG y la cantidad de PKC asociada a la membrana (Birt et al., 1992; Choe et al., 1992). 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 (Sumida et al., 1993; Clandinin et al., 1991; Merrill and Schroeder, 1993; Graber et al., 1994; Divecha and Irvine, 1995). Por el contrario, el ácido araquidónico inhibe algunas quinasas (Sumida et al., 1993). También se ha descrito que los PUFA oxidados inhiben tirosina fosfatasas (PTPasas), y por tanto incrementarían en general la fosforilación de tirosinas de las proteínas celulares. En trabajos in vitro se ha comprobado que determinados metabolitos del ácido linoleico pueden inhibir la defosforilación del EGFR, aumentando así la cascada de señalización intracelular (Vacaresse et al., 1999; Glasgow et al., 1997; Schley et al., 2007), aunque resultados obtenidos por el grupo investigador no muestran modificación de la activación de EGFR por los lípidos de la dieta, en los adenocarcinomas mamarios experimentales (Solanas et al., 2010).

Tal como ya se describió ampliamente en el apartado anterior, los lípidos de la dieta pueden afectar la actividad de las proteínas señalizadoras de la familia Ras, reguladores críticos de funciones celulares tan importantes como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis.

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 (Reyes et al., 2004). Otros trabajos han demostrado que

los PUFA n-6 reducirían la duración del ciclo celular, mientras que los PUFA n-3 inhibirían el crecimiento tumoral mamario (Rose, 1997; Cave, 1997; Snyderwine et al., 1998; Reyes et al., 2004), y los MUFA n-9, lo inhibirían a elevadas concentraciones, mientras que a bajas concentraciones ( $<1 \mu\text{g/ml}$ ) tendrían un efecto estimulador (Rose and Connolly, 1990).

Por otra parte, a partir de los fosfolípidos de membrana se producen FFA precursores de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano 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 (ácido eicosapentanoico) (Cave, 1997), que muestran diferentes efectos, en algunos casos, contrarios (Weber, 1990). PGE<sub>2</sub>, producto del ácido araquidónico, promovería la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular, y potenciaría la progresión tumoral, promoviendo la angiogénesis del tumor y las metástasis (Stoll, 2002; Larsson et al., 2004). 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 (Cohen et al., 1986a). 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 (Nakayama et al., 1993; Mizukami et al., 1992). En relación a los lípidos n-3, CLA y ácido oleico, se ha postulado que su efecto protector se basaría en la utilización de las mismas enzimas de la síntesis de prostaglandinas que los n-6. Este hecho induciría un cambio en las proporciones del tipo de eicosanoides sintetizados (Banni et al., 1999; Bartsch et al., 1999; Rose and Connolly, 1990; Larsson et al., 2004). 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 (Visioli, 1998; Rao et al., 1998; Smith et al., 1998; Newmark, 1999; Kris-Etherton et al., 1999).

### **3.5. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.**

Numerosos trabajos han descrito que diferentes componentes de la dieta (PUFA, colesterol, glucosa/fructosa, determinados minerales y vitaminas liposolubles) pueden modular específicamente la transcripción génica, el procesamiento y la estabilidad de los transcritos de genes implicados en diversas vías del metabolismo (glucólisis, lipogénesis, etc.) (Clarke and Jump, 1993; Clarke and Abraham, 1992; Kaput and Rodriguez, 2004).

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 (Clarke and Jump, 1993; Kaput and Rodriguez, 2004). 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 (Blake and Clarke, 1990; Jump et al., 1993; Clarke, 2001). 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 (Clarke and Jump, 1994; Kim and Tae, 1994; Landschulz, 1991). Esta acción de los PUFA depende de una serie de condiciones: un contenido mínimo de 18 carbonos; un mínimo de 2 dobles enlaces localizados en las posiciones 9 y 12, uno de los cuales puede estar en configuración trans; y sufrir desaturación por la  $\Delta 6$ -desaturasa (Clarke and Abraham, 1992). También se ha constatado que los PUFA inducen la expresión de genes implicados en la oxidación lipídica y la termogénesis (Clarke, 2000).

Además, hay cada vez más evidencias de que los lípidos pueden regular la expresión de genes implicados en la transformación neoplásica. Trabajos in vitro realizados en diferentes líneas celulares humanas de cáncer de mama tratadas con PUFA n-3 mostraron cambios en la expresión de genes implicados en apoptosis, señalización intercelular, comunicación celular, metabolismo o interacción con patógenos. Por el contrario, tal efecto no fue observado en el caso de los PUFA n-6 (Hammamieh et al., 2007). Por otra parte, la administración de ácido linoleico a células tumorales mamarias indujo cambios en la expresión del receptor de estrógenos  $\alpha$ , la proteína G G13a, la p38 MAPK, así como de genes implicados en la

regulación del ciclo celular y la transcripción del ARN (Reyes et al., 2004). 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 (Welsch and Aylsworth, 1983). 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 (Himeno et al., 1992; Tillotson et al., 1993).

Además, los ácidos grasos o sus metabolitos han demostrado poder controlar la actividad de algunos factores de transcripción, mediante su unión y activación de varios receptores nucleares, incluyendo la familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), el receptor X hepático (LXR) tipo  $\alpha$ , el del ácido retinoico (RX) tipo  $\alpha$  y el receptor nuclear hepático 4 (HNF-4) tipo  $\alpha$ . Igualmente, los ácidos grasos pueden actuar alterando la actividad o la abundancia nuclear de los factores de transcripción sin necesidad de unirse a ellos, como es el caso de NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), SREBP (sterol-regulatory element-binding protein), c/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein B) y HIP-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) (Jump, 2004; Khan and Vanden Heuvel, 2003).

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 (Solanas et al., 2002a; Escrich, 2006). Además, la ingesta de dicha dieta aumenta los niveles de ARNm de  $\beta$ -Actina y de su transportador ZBP1, cuya desregulación se asocia con un fenotipo tumoral de mayor malignidad (Moral et al., 2008).

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 (Hamid et al., 1999; Stoll, 2002; Larsson et al., 2004; Xue and Warshawsky, 2005). Algunos oncogenes y genes supresores de tumores, también pueden ser regulados por los ácidos grasos, directa o indirectamente. Entre ellos se encuentran ErbB2/Neu (Menendez et al., 2005), c-myc y c-Ha-ras (Fernandes and Venkatraman, 1991; Davis and Snyderwine, 1995), c-fos y COX-2 (Hughes-Fulford et al., 2001), p53, Bcl-2, Bcl-

## *Introducción*

xL y Bak (Tillotson et al., 1993; Ronai et al., 1995) y BRCA1 y BRCA2 (Kachhap et al., 2000; Bernard-Gallon et al., 2002) entre otros. La expresión de EZH2, una proteína nuclear modificadora de histonas, implicada en regular la conformación de la cromatina, también se ha encontrado influida por ácidos grasos pudiendo así ejercer un efecto sobre la regulación epigenética de la expresión génica (Dimri et al., 2010; Escrich et al., 2011). Otros estudios han demostrado efectos sobre genes involucrados en angiogénesis, invasión y metástasis, como E-cadherina (Jiang et al., 1995), Maspina (Jiang et al., 1997) 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  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), metaloproteasas de matriz (MMPs) y  $\beta$ -Catenina (Spencer et al., 2009).

Los efectos inespecíficos de las dietas hiperlipídicas en el cáncer de mama experimental, relacionados con su aporte energético, han sido asociados por el equipo investigador con la influencia que dichas dietas pueden ejercer en la regulación de la expresión de genes hepáticos como la carnitina palmitoil transferasa tipo 1 (CPT-1) y la sintasa HMG-CoA, implicados en el metabolismo lipídico. Los resultados obtenidos, junto con los cambios observados en el perfil lipídico y el peso y masa corporal, sugieren que el cáncer modifica la regulación de dicho genes por los lípidos de la dieta, así como la expresión de PPAR $\alpha$  (Owen et al., 2000b).

En los últimos años, con la llegada de las técnicas de análisis de la expresión génica mediante Microarrays, se han publicado diversos trabajos sobre el efecto de los lípidos de la dieta en el perfil de expresión génica en células tumorales. El equipo investigador, utilizando dicha tecnología, identificó 4 genes diferencialmente expresados en cáncer de mama experimental por efecto de una dieta rica en PUFA n-6:  $\alpha$ -2u globulina submaxilar, VDUP1 (vitamin D3-upregulated protein 1), el gen improntado H9 y un gen de función desconocida que codifica la secuencia de expresión (EST) 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 (Escrich et al., 2004). 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 (Reyes et al., 2004), apoptosis, interacción huésped-patógeno, señalización y comunicación celular, transducción de señales y metabolismo (Hammamieh et al., 2007). En modelos de cáncer de próstata y de colon, dietas hiperlipídicas han mostrado influencia sobre la expresión de genes implicados en inflamación, metabolismo de ácidos grasos y glucosa, metabolismo de andrógenos y actividad de proteínas kinasas, así como de moléculas de la matriz intra- y extracelular, factores de crecimiento y genes de respuesta a andrógenos (Reyes et al., 2002; Davidson et al., 2009).

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 (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). 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 (Moral et al., 2016; Escrich, 2016).

### **3.6. EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.**

Los lípidos de la dieta son capaces de modular la respuesta inmune y la producción de citoquinas inflamatorias. Asimismo existe una asociación entre el proceso inflamatorio y el desarrollo tumoral (Mantovani et al., 2008), la cual está reconocida como una característica importante del desarrollo del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011). 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 (Grivennikov et al., 2010). La activación de dichos mecanismos desencadena la estimulación de determinados factores de transcripción en las células tumorales, como STAT3 y NFκB, que 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 (Mantovani et al., 2008).

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 (Larsson et al., 2004; Stulnig, 2003). 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 (Jump, 2004). Es probable que las prostaglandinas estén implicadas en el efecto inmunosupresor de los lípidos (Hillyard and Abraham, 1979). Por ejemplo, la PGE2 inhibe a macrófagos, células T y B, y estimula las células inmunosupresoras (De Vries and van Noorden, 1992; Hwang, 2000; Stulnig, 2003), además de inhibir la producción de algunas citoquinas, como interleucina (IL) 2 o interferón- $\gamma$ , y de estimular la de otras, como IL-4, IL-5 y IL-10. Por otro lado, se ha observado una inhibición de la proliferación de linfocitos *in vitro*, una disminución en la secreción de TNF, IL1, IL2 e IL6 y una inhibición de la actividad de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos por efecto del ácido araquidónico y los PUFA n-3 (Stulnig, 2003). 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 (Hwang, 2000).

Los estudios sobre los efectos del aceite de oliva en el sistema inmune son escasos, pero los datos disponibles indican que éste podría ser un potente mediador de la respuesta inmune y que podría modificar la producción inflamatoria de citoquinas. La atenuación de estos procesos que provoca el aceite de oliva podría explicar los efectos beneficiosos sobre el riesgo del cáncer (Stark and Madar, 2002). Se ha demostrado que el ácido oleico tiene efectos anti-inflamatorios (Calder et al., 2002). Además, algunos fenoles del aceite de oliva virgen extra pueden inhibir la producción de eicosanoides y citoquinas inflamatorios *in vitro* e *in vivo* (Moreno, 2003; Cavaglieri et al., 2003; Visioli et al., 1998). En ratas, se ha observado que la

ingesta materna de una dieta con 15% de aceite de oliva tiene un efecto inhibidor del cáncer de colon en la descendencia, predominantemente aumentando el número total de células linfáticas y de linfocitos CD8 (+) en los tumores (Kossoy et al., 2001). 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 (Yaqoob et al., 1998).

### 3.7. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Los xenobióticos son un amplio y heterogéneo grupo de compuestos químicos externos al organismo que requieren ser metabolizados para poder eliminarse. Su naturaleza química es variada pudiendo ser compuestos aromáticos, cadenas alquílicas o compuestos halogenados (Irigaray and Belpomme, 2010). Aunque no todos los xenobióticos representan un riesgo para la salud, un gran número de ellos pueden ser altamente tóxicos, teratogénicos y/o carcinogénicos, entre ellos, muchos de los contaminantes alimenticios, del aire y del agua (Wogan et al., 2004; Belpomme et al., 2007).

El metabolismo de xenobióticos consta de dos fases: en la primera, las reacciones llevadas a cabo producen la activación hacia compuestos más reactivos, y en la segunda tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas que aumentan la hidrosolubilidad de los compuestos originariamente lipofílicos y favorecen su excreción, además de reducir su capacidad reactiva (Omiecinski et al., 2011; Castell et al., 2005). El principal órgano metabolizador de xenobióticos es el hígado, debido a la mayor concentración y diversidad de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs, *Xenobiotic Metabolizing Enzymes*), seguido del intestino, el pulmón, el riñón y la piel (Donato, 2003; Castell et al., 2005).

Entre las XMEs implicadas en el metabolismo de fase I se encuentran monooxigenasas de la familia de los CYPs (*Cytochrome P450*), que representan entre el 70-80% de estas enzimas, además de otras como oxidorreductasas, epóxidohidrolasas y peroxidasas. La superfamilia de los CYPs es un grupo de hemoproteínas catalíticas, entre las cuales las familias CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 y CYP7 son las principalmente involucradas en el metabolismo hepático y extrahepático de los xenobióticos (Donato, 2003; Omiecinski et al., 2011; Castell et al., 2005). Los CYPs son capaces de

metabolizar un gran número de sustratos debido a su baja especificidad, ya que existen múltiples formas de la enzima, cada una de las cuales está adaptada al metabolismo de grupos compuestos relacionados estructuralmente (Donato, 2003).

Por otra parte, las principales reacciones que se encuentran en la fase II son glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación con glutatión y/o con aminoácidos. Las principales familias de enzimas implicadas en el metabolismo de la fase II son UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs), sulfotransferasas (STs), N-acetiltransferasas (NATs) y glutatión s-transferasas (GSTs), además de algunas metiltransferasas como S-metil transferasas y O-metil transferasas. También forman parte de esta fase algunas flavoproteínas como NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1, *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*), que cataliza la reducción de compuestos quinona hasta hidroquinonas contribuyendo a su detoxificación metabólica, sin necesidad de conjugarlos con otras sustancias endógenas. En general, las reacciones pertenecientes a la fase II se caracterizan por una alta capacidad metabólica pero por una baja afinidad por los sustratos xenobióticos, como en el caso de las GSTs, o por una alta afinidad pero baja capacidad metabólica, como en el caso de las STs (Omiecinski et al., 2011; Xu et al., 2005).

Se ha descrito que numerosos compuestos de la dieta que han mostrado efectos beneficiosos sobre la salud, podrían actuar, al menos en parte, modulando el metabolismo de los xenobióticos y, por tanto, su toxicidad. En este sentido, algunos compuestos dietéticos pueden regular la expresión de las XMEs a través de la activación o inhibición de los factores de transcripción correspondientes. Concretamente, los ácidos grasos y sus derivados pueden modular la actividad de CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), PXR (*Pregnane X Receptor*), PPARs (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) y Nrf2 (*Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*), haciendo que los niveles de expresión de las XMEs puedan verse afectados por el tipo de lípidos presentes en la dieta (Murray, 2007; Busbee et al., 2013). Dentro de las XMEs, la familia de las CYP1s presenta una gran capacidad de respuesta ante diferentes factores dietéticos, entre ellos, los lípidos de la dieta. En este sentido Merrill y colaboradores (La Merrill et al., 2009) han descrito la diferente respuesta al xenobiótico

2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) en ratones alimentados con una dieta rica en ácidos grasos respecto a una dieta control a través de sus efectos sobre Ahr.

Además, algunos compuestos fitoquímicos pueden modificar la regulación y actividad de muchos de estos citocromos (Conney, 2003; Murray, 2007). En este sentido, se ha demostrado un aumento de la expresión de CYPs así como de sus niveles proteicos en células de cáncer de mama MCF-7 tras su tratamiento con polifenoles del cacao (Oleaga et al., 2012). Además, trabajos realizados con resveratrol y genisteína han demostrado en células MCF-10A un efecto modulador de la expresión de estas enzimas (Leung et al., 2009b; Leung et al., 2009a).

Cabe destacar de los lípidos de la dieta también podrían ejercer su acción sobre el metabolismo de xenobióticos de manera indirecta, en cuanto que una dieta rica en ácidos grasos puede conllevar situaciones de obesidad. Diferentes estudios muestran una correlación positiva entre animales obesos y un aumento de la sensibilidad a los xenobióticos debido principalmente a una disminución de la eliminación de éstos, ya que la mayoría son de naturaleza lipofílica y tienden a acumularse en el tejido adiposo (Brill et al., 2012; Jandacek and Tso, 2001; La Merrill et al., 2013).

#### 4. MODELO EXPERIMENTAL

Los experimentos *in vivo* son esenciales para el estudio de la patología mamaria. En este trabajo se escogió un modelo que utiliza ratas *Sprague-Dawley* sobre las que se aplica un carcinógeno químico, el DMBA (7,12-dimetil-1,2-benzatraceno) (Figura 5), capaz de provocar la aparición de tumores mamarios de características muy parecidas a las de los tumores humanos (Escrich, 1987b; Costa et al., 2002). La inducción tumoral se efectuó siguiendo el método de Huggins C y colaboradores (Huggins et al., 1961a; Huggins et al., 1961b) modificado (Escrich, 1987a). Este carcinógeno, administrado por instilación buco-gástrica, presenta una serie de ventajas con relación a otros carcinógenos químicos, entre las que destacan: efectos extratumorales moderados (leucopenia, alteraciones del crecimiento), siempre y cuando la dosis no sea superior a la descrita (20 mg DMBA/animal); mortalidad post-inducción prácticamente nula; practicabilidad de la técnica; y alto rendimiento

en la promoción específica de tumores mamarios con características similares a los humanos.

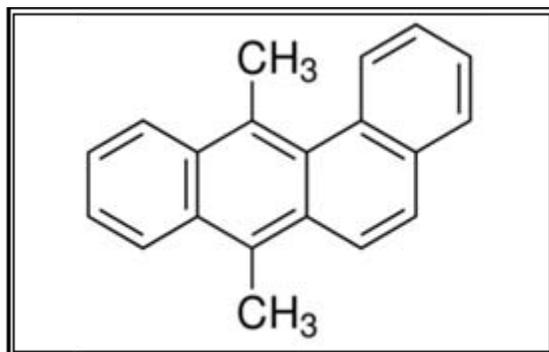


Figura 5. Molécula del carcinógeno 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA).

El DMBA (Figura 5) es un compuesto lipófilico que forma parte de la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs). Dichos compuestos se activan principalmente por las enzimas citocromo P450 (CYPs). Las formas moleculares intermediarias del proceso de oxidación que catalizan son especies electrofílicas reactivas (los metabolitos carcinogénicos), capaces de interactuar con macromoléculas celulares, particularmente ácidos nucleicos y proteínas.

Se han descrito tres vías principales de metabolización/activación del DMBA: 1) monoxigenación y formación de diol-epóxidos, 2) oxidación por transferencia de un electrón y formación de radicales catiónicos, y 3) oxidación dependiente de NADPH y formación de o-quinonas (Xue and Warshawsky, 2005). Los complejos formados por la unión directa de los metabolitos generados por estas vías y el ADN, sin que se produzcan cambios estructurales en ninguna de las moléculas, constituyen los denominados aductos. Estos complejos pueden ser estables, y permanecer en el ADN, a menos que sean reparados por los mecanismos de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). Por otra parte, los aductos pueden ser depurinizantes, liberándose del ADN por ruptura del enlace glicosídico entre la base purínica y la desoxiribosa (Chakravarti et al., 1995; Hollander et al., 2001). Si los aductos no son eliminados ni el ADN reparado, estos constituyen lesiones premutagénicas que preceden la iniciación tumoral (Izzotti et al., 1999).

La primera vía descrita está considerada como el mecanismo dominante de metabolización del DMBA. Tiene lugar principalmente en la región *bay* de la molécula, a partir de la cual se generan los metabolitos más reactivos, siendo éstos los más estudiados (Dipple, 1987; Hall, 1990; Dipple, 1994). Los PAHs pueden contener en su estructura una región *bay* o en algunos casos una región llamada *ffjord*. Estas son zonas de la molécula donde los anillos aromáticos se encuentran más próximos y se genera una región de mayor impedimento estérico. Los diol epóxidos de las regiones *bay* o *ffjord* son electrófilos con una gran capacidad de interactuar con el DNA mientras que algunos de los isómeros diol-epóxidos formados en regiones no *bay* o *ffjord*, tienen una menor capacidad mutagénica y/o carcinogénica (Singer and Kusmierek, 1982; Hall, 1990; Xue and Warshawsky, 2005; DiGiovanni et al., 1980). Estudios en microsomas hepáticos de rata han determinado que para la mayoría de PAHs su metabolismo da lugar a la formación de diol-epóxidos en la región *bay* principalmente (entre el 60-90% en comparación con el resto de posibles metabolitos formados) (Xue and Warshawsky, 2005; DiGiovanni et al., 1980). En el caso de la estereoisomería del DMBA, se pueden formar cuatro enantiómeros de los diol-epóxidos de la región *bay* que a su vez pueden clasificarse en dos diastereoisómeros dependiendo de la disposición espacial de los grupos sustituyentes, como anti-7,12-DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido y sin-DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido, ambos con distinta capacidad iniciadora de la carcinogénesis.

Otra de las vías metabólicas del DMBA, también catalizada por las enzimas CYPs o por enzimas con capacidad peroxidasa, consiste en la formación de radicales catiónicos que se forman a través de la pérdida de un electrón mediante una oxidación electrónica. Estos radicales catiónicos son electrofílicos con capacidad para interactuar con centros nucleofílicos de macromoléculas celulares (Cavaliere and Rogan, 1995). La probabilidad de una molécula de PAH para perder un electrón está relacionada con varios factores, entre ellos: 1) los bajos niveles de potencial de ionización (Ionization potencial, IP), 2) la localización de la carga y 3) la configuración geométrica que facilite la unión covalente con centros nucleofílicos, por lo que puede existir una regioselectividad para la localización de la carga positiva dentro de la molécula. En el caso del radical catiónico del DMBA esta carga puede localizarse predominantemente en las posiciones de los carbonos 7 o 12,

formándose dos posibles grupos metilo electrofílicos con capacidad de interactuar con centros nucleofílicos (Xue and Warshawsky, 2005). Los radicales catiónicos son altamente reactivos e inestables por lo que son difíciles de aislar para identificarlos. Estos radicales rápidamente forman aductos, que en el caso de los del ADN son inestables y producen depurinizaciones espontáneas (Cavaliere and Rogan, 1995). La interacción entre los radicales catiónicos y el ADN se produce a través de una unión principalmente con las posiciones N7 de las bases de guanina y/o las N3 de las adeninas, tras lo cual los enlaces glicosídicos con la desoxiribosa son debilitados y se rompen, liberándose el complejo PAH-base púrica y generando un sitio apurínico en el ADN, que puede derivar en la generación de mutaciones (Cavaliere and Rogan, 1995; Xue and Warshawsky, 2005).

Finalmente, la última vía de metabolización del DMBA es la formación de O-quinonas. A partir de los dihidrodioles formados por los CYP1s durante una primera etapa común a la vía de formación de diol-epóxidos, mayoritariamente de naturaleza trans y próximos a la región bay, éstos pueden sufrir una oxidación por las enzimas pertenecientes a la familia de las AKRs (*Aldo-keto reductases*), una superfamilia de oxidoreductasas citosólicas dependientes de NADPH, de manera que los dioles se oxidan hasta cetonas. Posteriormente, de forma espontánea, el grupo cetona se reorganiza hasta catecol, que es poco estable y sufre una autooxidación hasta formar una o-quinona. Los PAHs o-quinonas son electrofílicos y altamente reactivos con compuestos endógenos nucleofílicos. De esta manera, pueden formar conjugados con glutatión favoreciendo su eliminación, o con el ADN dando lugar a aductos que pueden ser tanto estables como depurinizantes (Xue and Warshawsky, 2005; Zhang et al., 2012). Además, los PAHs o-quinonas pueden sufrir una reducción tanto enzimática como no enzimática para volver a formar el catecol original a través de una reacción dependiente de NADPH. Este proceso da lugar a un ciclo redox que amplifica la formación de ROS, con capacidad para causar daño en el ADN mediante la formación de 8-oxo-dG, una lesión que contribuye a la formación de mutaciones en el ADN por conversiones G→T (Zhang et al., 2012).

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

para formar un hidroximetilo, el cual podría ser esterificado por una Sulfotransferasa dando lugar a la formación de un éster sulfúrico altamente reactivo (Xue and Warshawsky, 2005).

Los factores críticos del modelo experimental de cáncer de mama inducido con DMBA son: 1) la especie animal receptora, 2) la dosis de carcinógeno, y 3) el momento de administración del carcinógeno por instilación gástrica. En cuanto a la especie seleccionada, la rata es el animal que mejor se ajusta a las necesidades del modelo porque: a) a pesar de la distancia de especie, cumple las condiciones mínimas de semejanza para que los resultados de la experimentación animal puedan ser útiles a la hora de abordar el problema en humanos; b) posibilita el ensayo útil y practicable ya que es un animal fácilmente manipulable; c) posee la propiedad de la hormonodependencia de los tumores mamarios, de tanta trascendencia en humanos; d) los tumores desarrollados inducidos con DMBA son del mismo tipo anatomopatológico que los tumores humanos (Costa et al., 2002); e) presenta hasta los ocho meses aproximadamente una incidencia de tumores espontáneos muy baja; f) los tumores espontáneos más frecuentes son los de mama, fundamentalmente benignos -fibroadenomas-, siendo los malignos poco frecuentes, bien localizados y moderadamente invasivos (Altman, 1979); g) la vida media de la rata es de 30-40 meses, y el tiempo de latencia de la inducción tumoral es breve (20-40 días). En definitiva, la rata *Sprague-Dawley* es, por sus propiedades, una de las más utilizadas en las investigaciones oncológicas (Peckham, 1980).

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

## *Introducción*

tumores mayoritariamente mamarios, una alta incidencia y un alto contenido tumoral.

El momento en que se realiza la inducción es clave para la producción tumoral. La susceptibilidad de la glándula mamaria de la rata a los carcinógenos químicos depende del estado en que se encuentre el animal en el momento de la administración del carcinógeno. En general, los estudios que utilizan DMBA realizan la inducción en animales hembras de 50-55 días de edad, poco tiempo después de la edad media de la pubertad, cuando se dan una serie de características en el animal que lo hacen más receptivo a los efectos del carcinógeno. Además, esta edad coincide con la época de mayor síntesis de ADN en la glándula mamaria, en relación también con el estado hormonal (Nagasawa et al., 1976). Asimismo, se debe tener en cuenta el historial reproductivo de los animales, ya que la tasa de proliferación, y consecuentemente la cantidad de DMBA unido a ADN, es diferente según si la glándula mamaria es de una rata nulípara o múltipara. Así, las ratas vírgenes o nulíparas tienen una glándula mamaria con alto contenido en TEBs con elevada capacidad proliferativa, con una mayor captación de metabolitos reactivos del DMBA y formación de epóxidos. Además, tienen una menor capacidad para eliminar los aductos ya que la duración de la fase G1 del ciclo celular es menor. En cambio, estructuras más diferenciadas, como las AB, que predominan en la glándula mamaria de los animales preñados, se caracterizan por tener baja actividad sintética de ADN, bajo índice mitótico, baja captación de carcinógeno, y mayor capacidad para reparar daños en el ADN (Russo and Russo, 1996a; Russo et al., 1990). El DMBA induce en estos animales la formación de estructuras transformadas que en lugar de diferenciarse a AB proliferan intraductalmente formando microtumores (carcinomas intraductales). Estos progresan a carcinomas invasivos, desarrollando varios patrones: cribiforme, tipo comedo o papilar. Algunos TEBs presentes en la glándula mamaria en el momento de la inducción aún se diferencian en AB, pero su número siempre es menor que en animales no inducidos. Aquellos TEBs que ya se habían transformado en estructuras más diferenciadas (AB y estructuras lobulares tempranas) antes de la administración del carcinógeno, no desarrollan carcinomas (Russo and Russo, 1996a). La observación de que los carcinomas mamarios experimentales surgen de estructuras no diferenciadas (TEBs y TD) y que las

lesiones benignas, como adenomas, quistes y fibroadenomas, evolucionan de estructuras más diferenciadas, indicaría que el carcinógeno requiere de una diana estructural adecuada y que el tipo de lesión inducida es dependiente del área de la glándula mamaria afectada. Este hecho viene corroborado por la mayor incidencia de tumores localizados en las glándulas de la región torácica, que son las que mayor cantidad de TEBs poseen (Russo et al., 1983; Russo and Russo, 1987; Russo and Russo, 1996a; Thompson and Singh, 2000).

## **5. INFLUENCIA DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL**

El término estrés oxidativo fue acuñado por Sies H. en 1985 (Sies, 1985). Se define estrés oxidativo como el desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes a favor de estos primeros. Por lo tanto, el estado redox celular vendrá establecido por la concentración de especies oxidantes, como los radicales libres de oxígeno (ROS), y la capacidad de la célula para eliminarlos mediante sus mecanismos de defensa (Cadenas, 1997).

### **5.1. RADICALES LIBRES. DEFINICIÓN Y FUENTES**

El O<sub>2</sub> apareció en la atmósfera terrestre hace aproximadamente 2.2 billones de años como producto de desecho de la fotosíntesis realizada por cianobacterias. Los primeros organismos que aparecieron en la tierra fueron seres anaerobios que habitaban en una atmósfera rica en N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, pero conforme el O<sub>2</sub> se fue acumulando hasta los niveles actuales (21%) parte de estos organismos murieron y otros se restringieron a microambientes anóxicos. Sin embargo, una parte de los organismos se adaptaron a esta nueva situación y desarrollaron una serie de defensas para protegerse del O<sub>2</sub> dando lugar así a seres aerobios (Halliwell, 2006).

Estos nuevos seres aerobios comenzaron a aprovechar el oxígeno terrestre para generar energía en sus mitocondrias en forma de ATP mediante la cadena de

transporte de electrones. Esta energía permitió la evolución de estos organismos a seres pluricelulares mucho más complejos (Lane, 2003).

El primer investigador que trató el tema de la toxicidad del  $O_2$  fue *Rebeca Gerschman* y *Dan Gilbert* en 1954. La toxicidad del oxígeno radica en su capacidad para generar radicales libres. Dos años más tarde, *Harman D* describió el papel que juegan los radicales libres en el envejecimiento (Gerschman et al., 1954; Harman, 1956).

Se define radical libre como toda molécula o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su última capa de valencia, lo que le confiere cierto grado de reactividad. Son altamente inestables pero capaces de existir de manera independiente. El radical libre más simple es el radical de hidrógeno ( $H\cdot$ ), que contiene un protón y un electrón (Halliwell, 1993).

El término ROS hace referencia a todas las especies derivadas del  $O_2$  que son más reactivas que la molécula de  $O_2$  en sí misma. El término incluye por tanto, especies radicales (anión superóxido) y no radicales ( $H_2O_2$ ). Así, todos los radicales libres de oxígeno son ROS pero no todos los ROS son especies radicales. Algunos autores han tratado de evadir esta confusión terminológica haciendo referencia a estas moléculas como especies derivadas de oxígeno o simplemente oxidantes. Sin embargo, la molécula de  $H_2O$  es derivada del oxígeno, pero no más reactiva que ésta. Además, los ROS en ocasiones pueden actuar como reductores según las condiciones del ambiente en el que se encuentren. Es por todo esto que en la literatura se acepta ampliamente el término ROS para referirse a los radicales libres del oxígeno, incluyendo el  $H_2O_2$  (Halliwell, 2015).

Otra clase de radicales libres son las especies reactivas de nitrógeno o RNS que, junto con los ROS juegan un papel muy importante en los sistemas biológicos.

La principal consecuencia de los radicales libres es el daño de biomoléculas, como lípidos, ADN y proteínas. Sin embargo, en ocasiones, pueden tener un papel beneficioso, aspecto que se detallará a lo largo de este apartado.

Cada radical presenta un potencial de oxidación diferente de acuerdo con su reactividad. Los más importantes se detallan a continuación.

### - Anión superóxido

El anión superóxido ( $O_2^-$ ) se genera tras la adición de un electrón a la molécula diatómica de oxígeno (Miller et al., 1990). Se considera como el radical libre de oxígeno primario, ya que es capaz de interactuar con otras moléculas y dar lugar a radicales libres de oxígeno secundarios. Su producción ocurre principalmente en los complejos I y III de la mitocondria y es incapaz de atravesar membranas debido a su carga, por eso su daño se restringe al compartimento donde ha sido generado. Sin embargo, a través de una reacción de dismutación, el  $O_2^-$  es rápidamente convertido en  $H_2O_2$  que sí puede penetrar las membranas biológicas (Cross and Templeton, 2006). El  $O_2^-$  no reacciona directamente con polipéptidos, azúcares o ácidos nucleicos pero sí puede interactuar con otras moléculas generando otros radicales de forma directa o a través de procesos catalizados por enzimas o metales.

### - Radical hidroxilo

El radical hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ) tiene elevada reactividad y una vida media *in vivo* de aproximadamente un nanosegundo, lo cual hace que reaccione con moléculas muy cercanas a su lugar de origen. Puede ser originado por la reacción de *Fenton*, al reaccionar el  $Fe^{2+}$  con el  $H_2O_2$ . Presenta una gran habilidad para iniciar la peroxidación lipídica (Pinchuk et al., 1998) e interactuar con las bases del ADN dañándolas o produciendo rotura en sus cadenas. Un ejemplo es la formación de la base modificada 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG) que resulta de su interacción con la base guanina (Valko et al., 2006).

### - Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es capaz de atravesar membranas biológicas, lo que le confiere un importante papel en la señalización celular, por ejemplo, es capaz de activar factores de transcripción como el  $NF\kappa\beta$  (Packer and Cadenas, 2007). Su principal fuente de producción son los peroxisomas. Estos orgánulos mantienen muy finamente los niveles de  $H_2O_2$ , de manera que cuando existe una disminución de las enzimas encargadas de su descomposición (catalasa y peroxidasa), el  $H_2O_2$  puede ser liberado al citoplasma, lo que contribuye a aumentar el estrés oxidativo celular (Valko et al., 2007) o puede convertirse en  $^{\cdot}OH$ , que es mucho más reactivo.

- **Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) es generado por el endotelio vascular y su función principal es vasodilatador (Anderson, 1996). Es altamente reactivo, ya que se oxida rápidamente en presencia de oxígeno convirtiéndose en dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>). Juega un papel importante en la señalización celular y está implicado en procesos de neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismo de defensa, relajación muscular y regulación del sistema inmune. El NO es generado por la enzima óxido nítrico sintasa y tiene una vida media de unos pocos segundos en medio acuoso. Debido a su solubilidad tanto en medio acuoso como lipídico, el NO es capaz de difundir a través del citoplasma y la membrana plasmática (Anderson, 1996).

- **Peroxinitrito**

El peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) es generado en procesos inflamatorios, a partir de la reacción del anión superóxido y el óxido nítrico (Anderson, 1996). El metabolismo de ambos en la matriz mitocondrial está condicionado por la limitada difusión y rápida reacción entre ambos para producir ONOO. El ONOO<sup>-</sup> es un poderoso oxidante que apenas difunde desde el espacio intramitocondrial. Puede dañar la célula iniciando la peroxidación lipídica en la membrana o modificando proteínas en sus residuos tirosina (Keller et al., 1998).

- **Radical peroxil**

En los organismos, se forma el radical peroxil (ROO•) derivado de la adición de un radical oxígeno a un lípido. Este radical es altamente reactivo, aunque depende de la naturaleza del grupo R. Lo más interesante de los radicales peroxil es la diversidad de reacciones biológicas en las que pueden participar como, por ejemplo, en roturas del ADN y en modificaciones estructurales de proteínas. Asimismo, los radicales peroxil aumentan, de forma sinérgica, la inducción de daño en el ADN por O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

A nivel metodológico, la cuantificación exacta de los diferentes oxidantes es difícil porque presentan una vida media muy corta y rápidamente reaccionan con otros compuestos formando nuevas moléculas.

El origen de los radicales libres es muy diverso. Pueden ser generados en el interior de la célula por las denominadas fuentes endógenas, o tener su origen en fuentes exógenas.

Entre las fuentes exógenas destacan muchos agentes ambientales, entre ellas destaca la exposición a la radiación UV, el tabaquismo o la ingesta de dietas ricas en grasas (Sies et al., 2005). Determinados xenobióticos, como compuestos clorados, metales iónicos o fármacos como los barbitúricos, también son capaces de inducir radicales libres en la célula (Valko et al., 2006). Un ejemplo sería el compuesto 2-butoxietanol, el cual es capaz de provocar cáncer en ratones mediante su generación indirecta de radicales libres (Wallace, 1997).

Aunque la exposición del organismo a los ROS de fuentes exógenas es elevada, la exposición a las fuentes endógenas es más importante y amplia. La generación de radicales libres en el organismo es un proceso continuo y dura toda la vida de la célula o del organismo. Diversos procesos celulares son causantes de la generación de radicales libres, entre ellos destacan procesos como la explosión o estallido respiratorio. Este proceso comienza con el reconocimiento por parte de diversas células del sistema inmune de un agente externo. Estas células producen una rápida liberación de ROS, como  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  por parte de la enzima NADPH oxidasa, que tienen por objetivo la destrucción del agente externo (Dahlgren and Karlsson, 1999). Además, diferentes procesos metabólicos como el sistema enzimático del citocromo P450 también son responsables de la generación de ROS, generalmente debido al consumo de NADPH (Zangar et al., 2004).

Sin embargo, la principal fuente endógena de radicales libres es la mitocondria. La cadena de transporte de electrones está situada en la membrana interna mitocondrial, es la principal fuente de ATP en la célula, y por tanto, esencial para la vida. El NADPH producido en diferentes procesos celulares como la glucólisis, oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs cede sus electrones a la cadena de transporte, transformándose así de NADPH en  $NADP^+$ . El NADPH actuaría así como primer dador de electrones, los cuales van avanzando por la cadena por medio de reacciones de oxidación reducción entre donantes y aceptores de electrones, pasando sucesivamente por los complejos de NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo bc1 y citocromo c. Esta energía es utilizada para

bombar protones a través de la membrana interna mitocondrial, lo que genera un gradiente electroquímico, que en última instancia será utilizado por la ATP sintetasa para dar lugar a ATP a partir de ADP y Pi (fosfato inorgánico). En el complejo citocromo c, el oxígeno molecular capta 4 electrones provenientes de la cadena de transporte y 8 iones de H, generando así dos moléculas de H<sub>2</sub>O (Halliwell, 1993) (Figura 6). La mayor parte del oxígeno que se consume es transformado en agua, pero el 1-3% restante da lugar a especies reactivas de oxígeno, en especial a O<sub>2</sub><sup>-</sup>, implicado en la fisiopatología de diversas enfermedades (Kovacic and Jacintho, 2001; Valko et al., 2001). El O<sub>2</sub><sup>-</sup> es generado por los complejos I y II de la cadena de transporte, pero debido a su carga no es capaz de atravesar las membranas, y es en el espacio intermembrana o bien en la matriz mitocondrial, donde es transformado en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

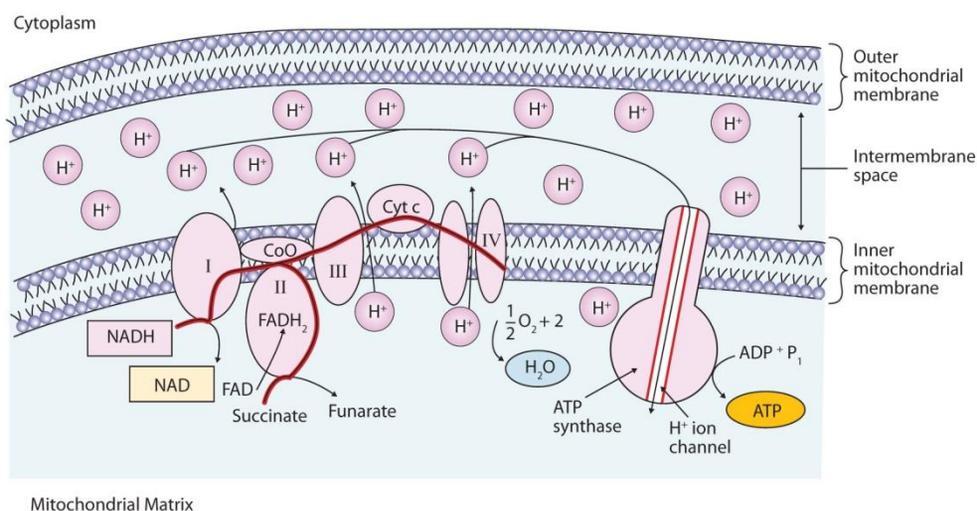


Figura 6. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. (David W. Ball, 2011)

## 5.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE

En condiciones de estrés oxidativo, los radicales libres son capaces de ocasionar daño en las biomoléculas, como lípidos, DNA o proteínas. Para paliar este daño la célula ha desarrollado diferentes mecanismos de defensa que implican principalmente sistemas de defensa antioxidante. Éstos a su vez se dividen en

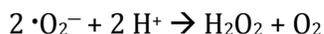
defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, y mecanismos de reparación de daño oxidativo del ADN.

### 5.2.1. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA

Las defensas antioxidantes enzimáticas son las enzimas que catalizan la conversión de agentes oxidantes en especies menos reactivas. Las enzimas que constituyen la primera línea de defensa y más estudiadas son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX).

#### - Superóxido dismutasa

Es la enzima antioxidante que cataliza la dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$  en oxígeno y en  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una especie reactiva de oxígeno es menos reactivo que el  $\cdot\text{O}_2^-$  y es eliminado posteriormente por la acción de las enzimas CAT o GPX. SOD fue aislada en 1939 pero no fue hasta 1969 cuando se demostró su capacidad catalítica (McCord and Fridovich, 1969). Actualmente está descrita como una de las enzimas antioxidantes celulares más eficientes. Esta enzima puede existir en diferentes isoformas según la naturaleza del metal de su centro activo, su secuencia de aminoácidos, el número de subunidades o sus cofactores. El mecanismo de acción de esta enzima se describe como “*ping-pong*” e implica sucesivas reacciones de oxidación-reducción del metal de su centro activo (Valko et al., 2006). En humanos están descritas tres isoformas de SOD: Cu,Zn-SOD o SOD1 (citosólica), Mn-SOD o SOD2 (mitocondrial) y EC-SOD (extracelular) (Landis and Tower, 2005).

La isoforma Cu,Zn-SOD o citosólica es un homodímero con un peso molecular de 32 KDa. Cada una de sus dos subunidades contiene como centro activo dos metales formando un *cluster* de iones Cu y Zn unidos por un residuo de histamina (Battistoni et al., 1998). Su actividad es relativamente independiente del pH pudiendo ser activa en un rango de 5 a 9,5. En cuanto a su papel en la carcinogénesis existen resultados contradictorios. Oberley y colaboradores fueron los primeros en estudiar el papel de esta enzima en el cáncer y describieron unos niveles bajos de Cu,Zn-SOD en la mayor parte de tumores, aunque con algunas excepciones (Oberley and Buettner, 1979).

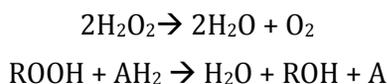
Sin embargo, los estudios más recientes muestran resultados tanto a favor de esta disminución como en contra. Así, se han descrito niveles bajos de SOD1 en cáncer de hígado (Oberley et al., 1978), mama (Petkau et al., 1977) y estómago (Monari et al., 2006), y niveles elevados de SOD1 en cáncer de mama (Seth et al., 2003), leucemia (Oberley and Buettner, 1979), cáncer de endometrio (Punnonen et al., 1993) y en diversas alteraciones ginecológicas (Pejic et al., 2006). Incluso en algunos estudios se propone esta enzima como diana en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Papa et al., 2014).

La isoforma Mn-SOD o mitocondrial constituye un hemotetrámero con un átomo de Mn en el centro activo de cada subunidad. Este metal cicla de Mn (III) a Mn (II) y vuelta a Mn (III) durante los dos pasos de dismutación del superóxido. Estudios en ratones *Knock-outs* demuestran que es una enzima esencial para la vida, al contrario que la isoforma citosólica (Li et al., 1995). En cuanto a su papel en la carcinogénesis, Oberley y colaboradores demostraron una disminución de sus niveles en todos los cánceres estudiados hasta el momento (Oberley and Buettner, 1979). Posteriormente, a favor de estos resultados, se han publicado trabajos donde se demuestra una disminución de la expresión de SOD2 en carcinoma ductal invasivo de mama (Tsai et al., 2011) y en estadios tempranos de adenocarcinoma de esófago (Martin et al., 2007). Sin embargo, otros estudios muestran niveles elevados de SOD2 en carcinoma escamoso de boca (Fu et al., 2011), los cuales se asocian a un mejor pronóstico; en estados avanzados de cánceres de cabeza y cuello (Salzman et al., 2007); cáncer de mama (Er et al., 2004); y varios tipos de cáncer de ovario (Hu et al., 2005). Algunos autores describen esta enzima como una de las más efectivas con actividad anti-tumoral (Valko et al., 2007; Oberley, 2005; Behrend et al., 2003). En este sentido, se han asociado niveles elevados de SOD2 con un retraso en el crecimiento tumoral (Kinnula and Crapo, 2004; Martin et al., 2007; Safford et al., 1994). Sin embargo, esta enzima está lejos de ser considerada una proteína supresora de tumores, ya que otros autores asocian su sobreexpresión a una mayor proliferación, capacidad de invasión y resistencia a fármacos (Sun et al., 1993; St Clair and Holland, 1991). En algunos casos, incluso, se ha propuesto como marcador de la evolución de algunos cánceres, como el melanoma donde sus niveles correlacionan positivamente con la carga tumoral (Schadendorf et al., 1995).

La isoforma extracelular EC-SOD es una glicoproteína tetramérica que contiene Cu y Zn en su centro activo y tiene elevada afinidad por los glicosaminoglucanos como la heparina. En mamíferos su regulación está determinada principalmente por citoquinas. Se encuentra en fluidos extracelulares como plasma, linfa y líquido sinovial diversos estudios demuestran que su expresión está disminuida en cáncer de pulmón debido a una hipermetilación aberrante en su promotor (Teoh-Fitzgerald et al., 2012).

#### - **Catalasa**

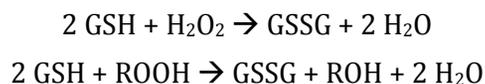
Es la enzima antioxidante que cataliza la transformación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Está formada por 4 subunidades idénticas de 60 KDa cada una que tiene en su centro activo un grupo ferriprotoporfirina. Es capaz de reaccionar tanto con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para dar lugar a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  como con dadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles) con actividad peroxidasa.



CAT es una de las enzimas con las tasas de intercambio más altas: una molécula de catalasa puede convertir unos 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno por minuto (Valko et al., 2006). Se localiza en los peroxisomas. Tiene un importante papel en la respuesta adaptativa celular a condiciones de estrés oxidativo. En este sentido, se ha descrito que la supervivencia de ratas a las que se les había inyectado CAT y SOD en liposomas estuvo aumentada cuando se les sometió a condiciones de 100% de  $\text{O}_2$  (Turrens et al., 1984). Los primeros resultados que se obtuvieron respecto su papel en la carcinogénesis demostraron que una disminución de su actividad en tumores se asociaba a un mayor crecimiento tumoral (Appleman et al., 1950). Sin embargo, posteriormente otros estudios demostraron que la sobreexpresión de CAT en células de cáncer de mama MCF-7 conllevaría un fenotipo menos agresivo y aumentaría su sensibilidad a algunos fármacos como paclitaxel, etopósido y trióxido de arsénico (Glorieux et al., 2011).

## - Glutación peroxidasa

Existen dos formas de esta enzima: la selenio-independiente, o glutatión transferasa (GST), capaz de metabolizar hidroperóxidos lipídicos, y la selenio-dependiente, o glutatión peroxidasa (GPX), capaz de metabolizar tanto el peróxido de hidrógeno como los hidroperóxidos lipídicos (Weydert and Cullen, 2010a). Estas dos formas difieren en el número de subunidades, la unión del selenio (Se) a su centro activo y su mecanismo catalítico. Es la principal fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo (Valko, Rhodes et al. 2006). Su mecanismo de acción consiste en la adición de dos electrones para reducir los peróxidos, formando así selenoles (Se-OH). Estas enzimas actúan conjuntamente con la molécula Glutatión (GSH). Como sustrato pueden usar  $H_2O_2$  o peróxidos orgánicos (ROOH) dando lugar así a agua o a alcoholes respectivamente, al mismo tiempo que oxidan el glutatión. Compiten con la CAT por el mismo sustrato.



En humanos existen 5 isoformas de enzimas GPX selenio-dependientes. La GPX citosólica (GPX1/c) es una proteína tetramérica formada por 4 subunidades, cada una de las cuales contiene un residuo de selenocisteína, su actividad fue descrita por Mills en 1957 (Mills, 1957). Su función principal consiste en el metabolismo del  $H_2O_2$  y otros peróxidos orgánicos como colesterol y ácidos grasos de cadena larga. Sin embargo, sólo en presencia de la Fosfolipasa A2 que libere los ácidos grasos, es capaz de transformar los hidroperóxidos de los ácidos grasos en fosfolípidos (Arthur, 2000). Estudios con ratones *Knock-out* de esta enzima, han comprobado que éstos presentaban un fenotipo normal en ausencia de estrés oxidativo, probablemente debido a que otras GPXs compensaban la ausencia de la GPX1. Esta situación no es comparable a la que se presenta en condiciones de bajos niveles de Se, donde además disminuye la actividad de otras GPX dependientes de Se (Ho et al., 1997). En cuanto a su papel en la carcinogénesis, se ha descrito que ratones transgénicos que sobreexpresaban GPX1 tuvieron una mayor respuesta en la iniciación de la carcinogénesis con DMBA que los ratones control (Lu et al., 1997).

Otros estudios han encontrado una asociación entre un aumento de actividad GPX1 y una disminución de la apoptosis celular. También se ha descrito su implicación en la progresión de un tumor, donde se encuentra directamente relacionada con el nivel de Se ingerido a través de la dieta. En este sentido, un suplemento de Se en la dieta reduce la mortalidad asociada a carcinomas de pulmón, próstata y cáncer de colon (Clark et al., 1996; Combs, 2004).

La GPX gastrointestinal (GPX2/giGPX) también es una proteína tetramérica y citosólica y tiene la misma afinidad por el sustrato que la GPX-1, sin embargo, GPX2 no es capaz de reducir los hidroperóxidos de los fosfolípidos (Arthur, 2000). Su localización específica en el epitelio del tracto gastrointestinal sugiere su función en el metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos de la dieta (Esworthy et al., 1998). Además, se ha descrito que podría actuar metabolizando los peróxidos acumulados producto del metabolismo oxidativo de xenobióticos en el hígado (Brigelius-Flohe, 1999).

La GPX plasmática (GPX3/pGPX) se encuentra glicosilada para llevar a cabo su función como antioxidante extracelular, ya que la glicosilación aumenta su estabilidad. Su presencia en leche sugiere su síntesis en las células del tejido mamario. Se cuestiona su función como peroxidasa en plasma, ya que requiere concentraciones de GSH de milimolar. Sin embargo algunos estudios demuestran que la pGPX es capaz de usar como dador de electrones el sistema tiorredoxina, ya que requiere unos niveles de tiorredoxina semejantes a los del plasma (Bjornstedt et al., 1994).

La fosfolípido hidroperóxido GPX (PHGPX /GPx4) es la isoforma que más difiere del resto, ya que consiste en un monómero y es capaz de utilizar como sustrato los hidroperóxidos de los fosfolípidos reduciéndolos a sus correspondientes alcoholes. Así, su función principal es la protección de las membranas lipídicas contra el estrés oxidativo (Loscalzo, 2008). En este sentido, GPX4 se caracteriza por prevenir la peroxidación lipídica (Arthur, 2000) debido a su capacidad de reducir, además del  $H_2O_2$  e hidroperóxidos lipídicos, hidroperóxidos de fosfolípidos, probablemente debido a su estructura monomérica, y además, puede utilizar como dadores de electrones otras moléculas diferentes al GSH (Maiorino et al., 1991; Arthur, 2000). Es la única peroxidasa esencial para la vida y bajo condiciones de severa deficiencia

de Se, la expresión de la enzima se mantiene constante mientras disminuye la expresión del resto de isoformas. Generalmente, su actividad es menor que GPX1 en todos los órganos, excepto en los testículos, donde constituye el 50% de las proteínas y ejerce una función como proteína estructural en la cabeza de los espermatozoides (Brigelius-Flohe, 1999; Ursini et al., 1999). Seiler y colaboradores (Seiler et al., 2008) la describen como un regulador esencial de las vías de muerte celular inducidas por peróxidos lipídicos específicos. En este sentido, se ha descrito que previene la apoptosis en situaciones de estrés oxidativo y favorece las vías de supervivencia (Savaskan et al., 2007; Nomura et al., 1999; Nakagawa, 2004).

La isoforma GPX5 corresponde al núcleo espermático GPX (snGPX/GPx). Está implicada en la condensación de la cromatina durante la espermatogénesis y en la protección del ADN del espermático frente al daño oxidativo (Pfeifer et al., 2001).

### 5.2.1.1. Regulación de la defensa antioxidante enzimática

La regulación de la inducción de la defensa antioxidante enzimática es un proceso complejo, en el que intervienen múltiples factores que activan genes implicados en la detoxificación o eliminación de ROS (Nguyen et al., 2009). En los últimos años, numerosos autores han estudiado la implicación del factor de transcripción NRF2 en este proceso, el cual definen como el principal inductor de la respuesta antioxidante enzimática. NRF2 es un factor de transcripción que posee en su estructura una cremallera básica de leucina (*Basic Leucine Zipper*, bZIP). El mecanismo de activación de NRF2 no está claro todavía, aunque está descrito que su activación está controlada, en parte, por la proteína citosólica KEAP1. En condiciones fisiológicas, la proteína KEAP1 (también llamada inhibidora de NRF2) se encuentra asociada a la proteína NRF2 y recluta a Cullin-2 E3-ubiquitina ligasa e interacciona con ella. Así marca a la proteína NRF2 con los residuos de ubiquitina necesarios para su degradación por la subunidad 26S del proteasoma. Sin embargo, en condiciones oxidantes, el aumento de los niveles de ROS promueven la disociación de NRF2 y KEAP1. Esta disociación es debida a la oxidación de los residuos de cisteínas (Cys273, Cys288, y Cys151) que son esenciales en la activación de KEAP1. Gracias a esta disociación, NRF2 se transloca al núcleo, donde dimeriza con otras proteínas de la familia b-ZIP (Maf-F, Maf-G y Maf-K) junto con las cuales se une a las regiones

promotoras de los genes antioxidantes (ARE, *antioxidant response elements*) e induce la transcripción de genes como glutatión reductasa (GR) y glutatión sintasa (GSS).

Existen además otros factores de transcripción que se activan como respuesta a la presencia de ROS. Generalmente, estas proteínas tienen en su estructura aminoácidos susceptibles de oxidación, como cisteínas, que al oxidarse generan un cambio conformacional que desencadena una señal, por ejemplo, la activación de una vía concreta (Paulsen and Carroll, 2013). Estos factores de transcripción controlan la expresión de genes protectores que implican mecanismos de reparación del ADN, potencian la respuesta inmune, detienen la proliferación de células dañadas o inducen la apoptosis (Valko et al., 2007). Ejemplos de estos factores son: el factor de transcripción NFκB, que está involucrado en la respuesta a procesos inflamatorios; AP-1 que juega un papel importante en el crecimiento celular y la diferenciación; p53, cuya inactivación supondría una proliferación celular descontrolada; NFAT, que regula la formación de citoquinas; y HIF1, que regula la expresión de un gran número de genes relacionados con procesos cancerígenos o inflamatorios (Valko et al., 2007).

### 5.2.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA

Las defensas antioxidantes celulares no enzimáticas implican moléculas que se oxidan para, de esta manera, ceder electrones a otros componentes celulares protegiéndolos de la oxidación. Es decir, se “sacrifican” oxidándose ellas mismas y reduciendo así a otras moléculas. Generalmente, estas moléculas disponen de ciclos redox (reducción-oxidación) que permite su regeneración una vez se oxidan. Se pueden clasificar en defensas endógenas y exógenas. Entre las defensas endógenas, destacan el Glutatión y la Tiorredoxina; y entre las exógenas las vitaminas C y E, y el ácido lipoico.

#### - **Glutatión**

Es el antioxidante tiol más importante. Consiste en un tripéptido y está considerado como el tampón redox celular. Es abundante en el citosol (1-11 mM), en el núcleo (3-15 mM) y en la mitocondria (5-11 mM), y es el antioxidante soluble

## Introducción

mayoritario en estos compartimentos celulares. Puede presentar dos formas: la reducida (GSH) y la oxidada (GSSG).

En la protección del estrés oxidativo el glutatión presenta varias funciones: 1) Es un cofactor de diferentes enzimas detoxificantes, por ejemplo de GPx y GST; 2) participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; 3) al igual que el ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol, elimina radicales libres reaccionando directamente con ellos de manera no catalítica, además de detoxificar el  $H_2O_2$  y peróxidos lipídicos a través de la acción catalítica de GPX; y 4) es capaz de regenerar los antioxidantes más importantes, las vitaminas C y E, devolviéndolos a su forma activa. Para llevar a cabo su función antioxidante, el GSH cede un electrón a especies oxidantes o reactivas. Estas especies tienden a captar este electrón reduciéndose o detoxificándose, ganando así mayor estabilidad y evitando que reaccionen con otras moléculas y ocasionen un daño. La capacidad antioxidante del glutatión radica en la estabilidad de la molécula resultante de la pérdida de un electrón ( $GS^\bullet$ ), que tiene una vida media significativamente más larga que otros radicales generados en condiciones de estrés. Las formas  $GS^\bullet$  pueden entonces dimerizar y dar lugar a dímeros GSSG. El GSSG se regenera a GSH mediante la enzima Glutathion Reductasa (GR), que utiliza como dador de electrones el NADPH (Figura 7). Los niveles celulares de Glutatión reflejan el balance entre las dos formas, oxidada (GSSG) y reducida (GSH).

El glutatión se encarga de mantener el estado redox adecuado de los grupos sulfhidrilo específicos de las proteínas, particularmente de aquellas que participan en procesos clave como la reparación o la expresión génica. En condiciones oxidantes, los grupos tiol de las proteínas (proteína-SH) se modifican mediante la pérdida de dos electrones dando lugar a grupos sulfénicos (proteína-SOH), o mediante la pérdida de un electrón, dando lugar a grupos radicales (Proteína-S $^\bullet$ ). Estos grupos reactivos pueden reaccionar con una molécula de GSH, dando lugar a proteínas S-glutationiladas (proteína-SSG), que son reducidas posteriormente por la GR para restaurar los grupos tiol originales de las proteínas (proteína-SH). Sin embargo, si en este proceso de oxidación de los grupos tiol no interviene el glutatión para regenerarlos, se produce la modificación irreversible de las proteínas oxidadas

con grupos como ácido sulfónico (proteína-SO<sub>3</sub>H) y sulfínico (proteína-SO<sub>2</sub>H) (Estrela et al., 2006).

El GSSG se acumula en el interior de la célula y la ratio GSH/GSSG es un buen marcador de estrés oxidativo celular. En condiciones normales esta ratio tiene un valor superior a 100 (Estrela et al., 2006). El GSSG también puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, dando lugar a proteína-SSG, con una vida media superior al dímero GSSG.

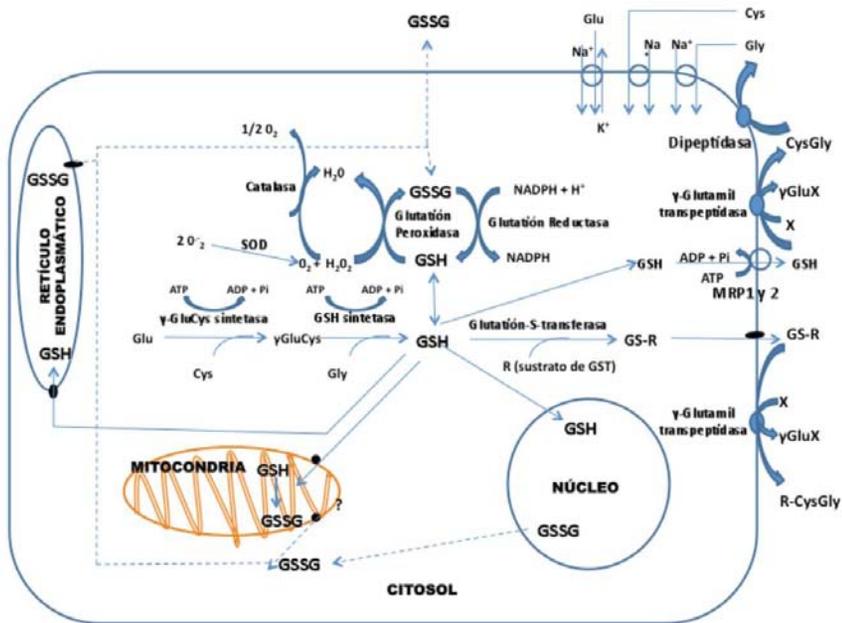


Figura 7. Metabolismo de glutatión en una célula de mamífero representativa (Martínez-Samano, 2011).

El GSH es sintetizado *de novo* a partir de los aminoácidos glicina, cisteína y ácido glutámico, y requiere la acción consecutiva de dos enzimas: la enzima γ-glutamilcisteína-sintetasa/ligasa (γGCS/GCL) y la glutatión sintetasa (GSS) (Figura 7). La regulación de sus síntesis es compleja. El factor limitante es la biodisponibilidad del aminoácido cisteína. Este aminoácido y su forma oxidada son transportados al interior celular mediante un transporte dependiente e independiente de Na<sup>+</sup>, respectivamente. Compuestos oxidantes como hidroperóxidos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y agentes electrófilos, inducen la captación de cisteína por parte de la célula y la expresión de la enzima γGCS. La región promotora del gen γGCS contiene un sitio de unión AP-1, una región ARE y un sitio de respuesta a

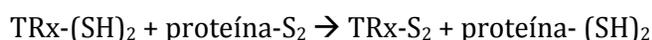
electrófilos. Además, modificaciones postraduccionales de este gen pueden afectar a la síntesis de glutatión. Por ejemplo, una fosforilación específica daría lugar a la inhibición de su síntesis. La concentración de GSH también interviene en la regulación de su síntesis mediante mecanismos de *feedback* negativo, por lo que una depleción de GSH también induciría la síntesis de esta enzima (Townsend, Tew et al. 2003).

Alteraciones en los niveles de GSH y su metabolismo se han asociado a diversas enfermedades como procesos neurodegenerativos, entre ellos Parkinson y Alzheimer (Sechi et al., 1996; Saharan and Mandal, 2014), Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Staal et al., 1990), cáncer (Traverso et al., 2013) o envejecimiento (Liu, 2002; Borras et al., 2003).

Debido a sus propiedades reductoras, el glutatión es capaz de inactivar diferentes carcinógenos protegiendo así la integridad del DNA y previniendo la peroxidación lipídica. En este sentido, se han descrito elevados niveles de GSH en diferentes tipos de tumores, como melanoma (Carretero et al., 1999), carcinoma de vejiga (Pendyala et al., 1997), pulmón (Honda et al., 2004), mama (Perry et al., 1993) y colon (Berger et al., 1994; Estrela et al., 2006). Por otro lado, los niveles de GSH oxidado aumentan cuando las células son expuestas a diferentes agentes químicos. Se ha descrito que un déficit de GSH podría conllevar la pérdida de función de P53, un gen supresor de tumores capaz de inducir la apoptosis celular. Esta proteína tiene en su secuencia residuos cisteína susceptibles de oxidación. En presencia de ROS, estos residuos pueden oxidarse, lo que conllevaría una pérdida de función de P53 y una evasión de la apoptosis por parte de la célula (Wu and Momand, 1998; Estrela et al., 2006).

### - **Tiorredoxina**

La tiorredoxina (TRx) es una pequeña proteína redox multifuncional, que contiene un puente disulfuro y presenta dos residuos de cisteína en su centro activo. Su forma reducida contiene dos grupos tiol adyacentes que se convierten en una unidad disulfuro en la tiorredoxina oxidada. Esto ocurre en reacciones redox con múltiples proteínas:



Los niveles de TRx son de 100 a 1000 veces inferiores a los de GSH, sin embargo, ambos pueden solaparse en sus funciones así como compartimentarlas. Estudios recientes han demostrado que TRx puede regular la actividad de algunas proteínas uniéndose directamente a ellas y también es capaz de pasar desde el citosol al núcleo como respuesta al estrés oxidativo para regular la expresión de genes. En este caso, el mecanismo del funcionamiento de TRx es el siguiente: TRx es reducido en su centro activo por la enzima tioredoxina reductasa (TR) dando lugar a TR-(SH)<sub>2</sub>; a continuación, TR-(SH)<sub>2</sub> entra al núcleo y regula la actividad de los factores de transcripción implicados en la replicación del ADN; y, finalmente, TR-(SH)<sub>2</sub> es excretado al exterior de la célula donde, junto a otros factores, estimula el crecimiento celular (Valko et al., 2006).

Se han encontrado niveles elevados de TRx en carcinoma cervical, tumores gástricos, hepatomas, carcinomas de pulmón y colorectales (Raffel et al., 2003; Soini et al., 2001; Powis et al., 2000). Estos niveles elevados de TRx pueden causar resistencia a la quimioterapia en tumores humanos. Además, se ha observado que una sobreexpresión de TRx protege a la célula de la apoptosis inducida por estrés oxidativo, confiriéndole así una ventaja en el crecimiento y supervivencia del tumor (Powis et al., 2000).

#### - **Vitamina C**

La vitamina C o ácido ascórbico es un potente antioxidante soluble en medio acuoso. Actúa conjuntamente con la vitamina E para regenerar los radicales de  $\alpha$ -tocoferol de las membranas y lipoproteínas. En su estructura tiene dos grupos hidroxilo ionizables. A pH fisiológico, alrededor del 99.9 % del ácido ascórbico presenta un grupo ionizado; el 0,05 % no se encuentra ionizado; y el 0,004 % presenta los dos grupos ionizados (Valko et al., 2006). Su función antioxidante radica en su capacidad para ceder un electrón a especies reactivas estabilizándolas. Se ha descrito que tiene un potencial efecto en la protección frente al cáncer de estómago, probablemente debido a su capacidad de inhibir la formación de compuestos N-nitrosos (You et al., 2000). Sin embargo, numerosos estudios han descrito el efecto antiapoptótico de la vitamina C (Jin et al., 2011).

- **Vitamina E**

La vitamina E se presenta en 8 formas:  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -tocoferoles y  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -tocotrienoles. Su función principal es la protección de las membranas frente a la peroxidación lipídica. El contenido lipídico de la dieta favorece la absorción de la vitamina E a través de micelas y su distribución en tejidos. Su naturaleza lipofílica la hace poco soluble en plasma, fluidos extracelulares y en citosol, por lo que se encuentra unida a proteínas específicas y lipoproteínas durante la absorción, el transporte y la distribución. La vitamina E es el mejor antioxidante liposoluble biológico, intra- y extracelular, considerándose el principal antioxidante de membrana adquirido por la célula. Una de sus funciones es frenar la peroxidación lipídica de la membrana eliminando radicales peroxil intermediarios. En esta reacción, la vitamina E cede un hidrógeno de su grupo hidroxilo convirtiéndose él mismo en radical (Anderson, 1996; Yoshida et al., 2003):



La vitamina E oxidada puede ser regenerada con ayuda de la Vitamina C o directamente por la acción del GSH. Estudios recientes describen el funcionamiento conjunto de la vitamina E y C en un proceso cíclico según el cual la molécula  $\alpha$ -tocoferol dona un electrón al radical lipídico formado, convirtiéndose así en  $\alpha$ -tocoferol radical, que es reducido por el ácido ascórbico, regenerando así el  $\alpha$ -tocoferol original (Kojo, 2004).

La vitamina E está implicada además, en regulaciones no antioxidantes que afectan a la rigidez de la membrana, la transcripción, la señalización intracelular, fotosíntesis, almacenamiento de macronutrientes y metabolismo de carbohidratos (Azzi et al., 2004; Yoshida et al., 2003)

Se ha descrito que la administración de vitamina E reduce la incidencia de cáncer colorectal promoviendo la apoptosis de las células tumorigénicas (White et al., 1997). Otros estudios describen efectos negativos al combinar vitamina E y C en la prevención de este tipo de cáncer y defienden que en tanto que la vitamina C regenera la vitamina E, los efectos protectores antioxidantes de la vitamina C estarían siendo enmascarados (Dreher and Junod, 1996).

## - **Ácido lipoico**

El ácido  $\alpha$ -lipoico (ALA) es un disulfuro derivado del ácido octanoico y un compuesto natural sintetizado en pequeñas cantidades por plantas y animales, incluidos los humanos. ALA es soluble tanto en medio acuoso como lipídico por lo que puede actuar en membranas celulares y en citosol. Es fácilmente absorbido a partir de la dieta y convertido rápidamente a su forma reducida, el ácido dihidrolipoico (DHLA) (Smith et al., 2004). Ambas formas, ALA y DHLA, son fuertes antioxidantes: eliminan ROS, regeneran antioxidantes endógenos y exógenos, como las vitaminas C y E y el Glutatión, y reparan proteínas oxidadas (Rossi et al., 2008). Además, ALA actúa como cofactor de diversos complejos enzimáticos del metabolismo (Bustamante et al., 1998).

Se han descrito efectos beneficiosos en enfermedades cardiovasculares, infecciones por el VIH y diferentes enfermedades neurodegenerativas (Bustamante et al., 1998). ALA previene la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas a la vez que estimula el secuestro de la glucosa. Mientras que en células sanas ALA previene la apoptosis inducida por oxidantes, en células cancerosas puede producir una parada del ciclo celular e inducir la apoptosis. Sin embargo, el mecanismo de acción de ALA en este tipo de células no está muy claro todavía (Rossi et al., 2008; Choi et al., 2009; Shi et al., 2008).

## **5.3. DAÑO EN BIOMOLÉCULAS POR EFECTO DE LOS RADICALES LIBRES**

### **5.3.1. DAÑO EN LÍPIDOS**

Los PUFA de los fosfolípidos de membrana son extremadamente sensibles a la oxidación por parte de los radicales libres. La presencia de dobles enlaces en los ácidos grasos debilita los enlaces sencillos C-H adyacentes, facilitando así la substracción de un átomo de H para crear un radical (Bartsch et al., 2002). Se admite la hipótesis de que la sensibilidad de los lípidos aumenta en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso (Wagner et al., 1994).

El mecanismo por el cual los lípidos de membrana son dañados por parte de los radicales libres se denomina peroxidación lipídica. Ésta se desarrolla en tres etapas:

iniciación, propagación y terminación. En la reacción de iniciación (Figura 8), un radical libre es capaz de captar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de la cadena alifática del ácido graso, lo que genera un radical (L•) que tiende a estabilizarse por resonancia. Existe una forma menos frecuente de iniciación que consiste en la introducción de un grupo hidroxilo en un grupo metileno.

En la fase de propagación, el radical formado reacciona rápidamente con una molécula de O<sub>2</sub> para formar un radicalo peroxilo (LOO•), que tiende a interaccionar con otro ácido graso sustrayéndole un electrón, dando lugar a un hidroperóxido (LOOH) y a un nuevo radical (L•), iniciándose así una reacción en cadena. En la fase de terminación, antioxidantes como la vitamina E donan un electrón a los radicales peroxilo formados (LOO•) formando así productos no radicales (LOOH) (Schaur et al., 2015). Como resultado del proceso se producen generalmente hidroperóxidos, pero también aldehídos, como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). El MDA está descrito como el producto más mutagénico y el 4-HNE como el más tóxico de la peroxidación lipídica.

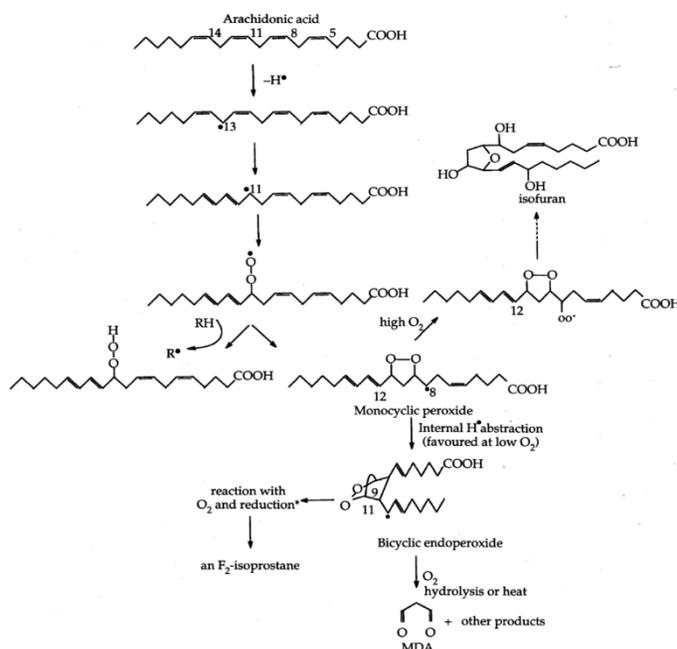


Figura 8. Proceso de peroxidación lipídica (Schaur et al., 2015).

El MDA es el producto final de la descomposición del ácido araquidónico y otros PUFAs de cadena larga tanto por procesos enzimáticos como no enzimáticos. Ha sido ampliamente estudiado como marcador de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos omega-3 y omega-6. Este compuesto es capaz de formar aductos con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y dar lugar a un compuesto fluorescente, lo que lo hace detectable (Wong et al., 1987). El MDA reacciona con los grupos amino básicos de las proteínas o ADN dañando estas biomoléculas (Pizzimenti et al., 2013; Niedernhofer et al., 2003). Recientemente se ha descrito el papel del MDA como señalizador celular y regulador de la expresión génica (Ayala et al., 2014).

La peroxidación lipídica puede iniciarse por radicales libres de manera espontánea, y en este caso puede ser contrarrestada por sistemas de protección antioxidantes, o puede iniciarse de manera enzimática, mediante las lipooxigenasas (Kuhn and Borchert, 2002). Las lipooxigenasas componen una familia de enzimas que oxigenan los PUFAs libres y esterificados dando lugar al correspondiente derivado hidroperóxido. Muchos de los sistemas antioxidantes de defensa naturales son inefectivos a la hora de modular la reacción de estas enzimas. De todas ellas, la isoforma 12/15-LOX es la única capaz de oxidar compuestos lipídicos unidos a membrana o a lipoproteínas, como fosfolípidos y ésteres de colesterol. La enzima PHGPX (GPX-4) es capaz de reducir estos hidroperóxidos lipídicos unidos a membrana a sus correspondientes alcoholes (Kuhn and Borchert, 2002). Realmente, la primera defensa celular enzimática contra la peroxidación lipídica es el ciclo redox del glutatión del cual forma parte dicha peroxidasa.

Algunos de los componentes minoritarios del aceite de oliva (compuestos fenólicos como hidroxitirosol y lignanos) presentan capacidad de reducir la peroxidación lipídica, reduciendo así el estrés oxidativo (Quiles et al., 2002; Mangas-Cruz et al., 2001; Weinbrenner et al., 2004; Thompson et al., 1996).

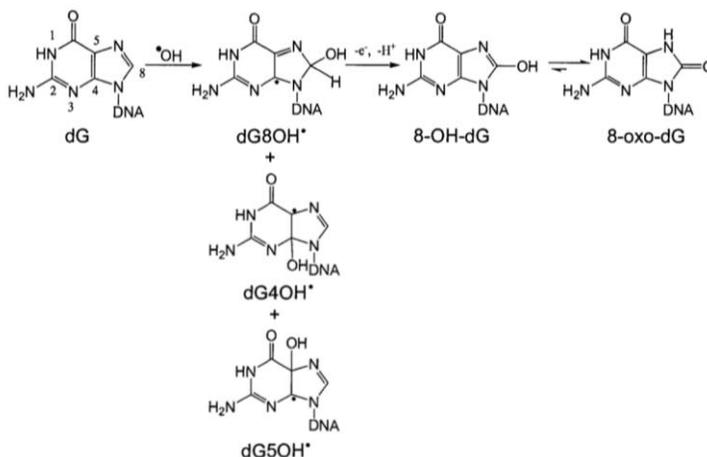
Todos los productos de la peroxidación lipídica pueden unirse al ADN y formar aductos exocíclicos y premutagénicos. Estos aductos son moléculas aromáticas planas que pueden dar lugar a sustituciones de pares de bases, siendo  $G \rightarrow T$  y  $A \rightarrow C$  las más frecuentes. La capacidad mutagénica del MDA viene dada por el elevado porcentaje de dichas sustituciones en el ADN. Fang y colaboradores (Fang et al., 1996) observaron un gran aumento en los niveles del aducto pirimido[1,2 $\alpha$ ]purín-

10(3H)-one ( $M_1G$ ) en linfocitos de mujeres que consumían una dieta rica en aceite de girasol en comparación con un grupo que consumía una dieta rica en aceite de colza. Los PUFA de la dieta estimularon un incremento de los niveles de  $M_1G$ . Otros autores obtuvieron el mismo resultado tras analizar el tejido mamario normal de mujeres voluntarias y pacientes con cáncer de mama. El nivel de  $M_1G$  resultó 2–3 veces más alto en el tejido mamario normal de pacientes con cáncer de mama en comparación con pacientes sanas. Paradójicamente, los niveles de  $M_1G$  en el tejido tumoral de mujeres con cáncer de mama fueron más bajos que los niveles en el tejido normal circundante (Valko et al., 2004).

### 5.3.2. DAÑO EN EL ADN

El radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) es capaz de reaccionar con todos los componentes de la molécula de DNA, dañando así tanto las bases púricas como pirimidínicas además de las moléculas de desoxirribosa (Dizdaroglu et al., 2002). El ataque y modificación permanente de este radical sobre el ADN representa el primer paso en los procesos de mutagénesis, carcinogénesis o envejecimiento. Se han descrito más de 100 productos resultantes de la oxidación del DNA, entre ellos roturas de simple y doble hebra, además de modificaciones sobre las bases púricas, pirimidínicas y desoxirribosas así como *cross-links* o intercruzamientos. Las consecuencias de este ataque electrofílico son diversas: parada del proceso de transcripción, activación de diferentes *pathways* y errores en la replicación. Todas estas consecuencias están relacionadas con la inestabilidad genómica y procesos de carcinogénesis (Marnett, 2000). La lesión oxidativa sobre el DNA más estudiada es la formación de la 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG). Esta lesión generalmente ocurre en  $1 \times 10^5$  residuos de guanina en una célula humana normal, por lo que está considerada como un buen marcador de estrés oxidativo en organismos (Valko et al., 2006). Su mecanismo de formación se muestra en la Figura 9.

El radical  $\cdot OH$  tiene afinidad por el carbono 4, 5 y 8 de la guanina, con lo que tras su adición se genera C4-OH, C5-OH y C8-OH radicales. La oxidación de dG8OH $\cdot$  por la pérdida de un H conlleva la formación de 8-OH-dG y 8-oxo-dG. La forma 8-oxo-dG es la más abundante ya que es la más estable en condiciones fisiológicas.



**Figura 9. Formación de la base modificada 8-oxo-dG por el ataque de un radical  $\cdot\text{OH}$  sobre la guanina (Yuan, 1997).**

### 5.3.2.1. Reparación del daño en el ADN

Las células han desarrollado una serie de defensas contra el daño sobre el ADN nuclear. Así, el ADN se halla bien compartimentado en el núcleo, está rodeado de histonas y además contiene un eficiente sistema enzimático de reparación. Concretamente, la reparación de la base modificada 8-oxo-dG se lleva a cabo mediante el sistema de excisión de base (*base excision repair*, BER) (Noren Hooten et al., 2011). BER implica un sistema *multistep* que es iniciado por el reconocimiento y la escisión de la base modificada y en el que intervienen diferentes proteínas.

El ADN mitocondrial también sufre el ataque constante por parte de los radicales libres. Este ataque es todavía mayor que en el ADN nuclear ya que, por una parte, en la mitocondria se genera la mayor parte de radicales libres provenientes de la cadena respiratoria y por otra, la molécula de ADN mitocondrial no se encuentra protegida por histonas. La menor protección del ADN mitocondrial respecto al nuclear así como su mayor proximidad a la cadena de transporte de electrones, hacen que los niveles de daño oxidativo sobre el ADN mitocondrial sean de 10 a 20 veces superiores que en el ADN nuclear. Por todo ello, la determinación de la base modificada por daño oxidativo 8-oxo-G en el ADN mitocondrial también representa un buen marcador de daño oxidativo en el organismo (Cadenas and Davies, 2000; Giulivi and Cadenas, 1998).

Mientras que las lesiones oxidativas del ADN nuclear tienen como consecuencia inestabilidad genómica y, con ello, procesos de carcinogénesis, el daño sobre el ADN mitocondrial también implica consecuencias graves para la célula, ya que éste codifica proteínas de la cadena de transporte de electrones, esenciales para el buen funcionamiento e integridad de la célula (Cadenas and Davies, 2000).

Las enzimas 8-oxoguanina-ADN glicosilasa (*8-oxoguanine-DNA glycosylase*, OGG1) y Poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (*Poly-(ADP-ribose) polymerase 1*, PARP1) participan en la reparación de la base modificada 8-oxo-dG (Noren Hooten, Kompaniez et al. 2011). La OGG1 reconoce eficientemente la base modificada 8-oxo-dG cuando está apareada con una citosina, a pesar de su estructura casi idéntica a la guanina, ya que sólo difieren en dos átomos. Se ha descrito que este mecanismo de reconocimiento podría estar basado en la diferencia de energía libre entre la guanina y su base modificada. Una vez reconoce la base modificada, la OGG1 provoca la escisión y rotura de la hebra. La PARP es un sensor de roturas en el ADN, detecta estos huecos y los repara. La OGG1 se une directamente a la PARP1 a través de su extremo N-terminal, y esta interacción está potenciada por estrés oxidativo (Noren Hooten et al., 2011).

Diversos estudios muestran la relación entre los lípidos de la dieta y la formación de la base 8-oxo-dG. Así, por ejemplo, sujetos alimentados con dieta mediterránea mostraban unos niveles inferiores de 8-oxo-dG en orina que sujetos alimentados con una dieta control (Mitjavila et al., 2013). Otros estudios muestran una disminución de los niveles de 8-oxo-dG tras una suplementación con PUFA-n3 en ratones (Abdel-Wahab et al., 2015). Otros compuestos dietéticos antioxidantes, como los carotenoides usados como biomarcadores de la ingesta de fruta y verdura, también se han asociado a una disminución de 8-oxo-dG en sujetos sanos (Cocate et al., 2015). De hecho, diversos autores muestran un efecto beneficioso de la ingesta de carotenoides y explican sus beneficios por su efecto protector sobre el daño oxidativo del ADN (Aune et al., 2012; Steinmetz and Potter, 1991).

### 5.3.3. DAÑO EN LAS PROTEÍNAS

Las proteínas constituyen el tipo de macromoléculas más susceptibles de sufrir daño oxidativo, habiéndose descrito que pueden ser atacadas por el 75% de los

radicales libres. Este hecho es debido a que las proteínas tienen una vida media considerablemente larga y por ello son más susceptibles al daño oxidativo (Celi and Gabai, 2015). En consecuencia, las proteínas dañadas constituyen un buen marcador de daño oxidativo (Davies, 2005).

Generalmente la oxidación de proteínas está descrita como una modificación covalente originada bien directamente por radicales libres o bien indirectamente por productos secundarios de estrés oxidativo. Las consecuencias varían desde una alteración de su función como receptores, enzimas, de transporte, etc. hasta la activación del sistema inmune, ya que pueden ser reconocidas como antígenos (Davies et al., 1999).

Las modificaciones que sufren las proteínas pueden ser irreversibles o reversibles. Entre las modificaciones irreversibles destacan la nitración de residuos tirosina y la carbonilación de diferentes aminoácidos, como arginina, histidina, lisina, prolina, treonina y cisteína. Ambas modificaciones han sido utilizadas como marcadores de estrés oxidativo en diferentes enfermedades y en envejecimiento (Stadtman, 2001). La carbonilación es el marcador de daño oxidativo en proteínas más utilizado, ya que existen más dianas en las proteínas que las hacen más detectables. Existen numerosos estudios que demuestran los efectos perjudiciales que conlleva la carbonilación de proteínas (Stadtman, 2001; Yan and Sohal, 1998). Sin embargo, actualmente también se han descrito efectos beneficiosos de este tipo de oxidación que generalmente implica la transducción de señales en vías que inducen la defensa antioxidante celular (Wong et al., 2008; Curtis et al., 2012).

En cuanto a las modificaciones por oxidación reversibles, éstas son exclusivas de los residuos cisteína. Entre ellas destacan la sulfonación, la nitrosilación y la glutationilación. La oxidación de residuos de cisteína es una modificación reversible que sufren las proteínas de manera selectiva, es decir, tiene lugar cuando se dan en consonancia una serie de condiciones. Bajo condiciones fisiológicas los residuos de cisteína tienen un pKa de aproximadamente 8.5, lo que hace imposible su modificación. Para que sea susceptible de oxidación, el valor de pKa del residuo de cisteína ha de ser inferior al del pH fisiológico (7.4). Si esto ocurre, el residuo de la cisteína se convierte en un grupo tiol  $-SH$  y pasa a ser un grupo redox activo. Esto hace que la oxidación de estos grupos sea un proceso altamente selectivo.

## *Introducción*

En la S-sulfonación (sulfo-hidroxilación P-SOH) por ROS un grupo hidroxilo (OH) sustituye al H del grupo tiol. Esta descrito que numerosas proteínas sufren este tipo de modificaciones que conllevan importantes cambios en su función (Poole et al., 2004). Las reacciones de S-nitrosilación están causadas por óxido nítrico, peroxinitrito y nitroxilo y se describen como equivalentes funcionalmente a la fosforilación o desfosforilación de proteínas (Wang et al., 2006). La S-glutationilación consiste en la conjugación de una proteína a una molécula de glutatión (GSH) mediante puentes disulfuro P-S-S-G, marcando así las proteínas y provocando en ellas cambios funcionales. Esta oxidación es clave en numerosos procesos como de transducción de señales, expresión génica, proliferación celular o apoptosis protegiendo así proteínas específicas en estos procesos de daño oxidativo (Wang et al., 2012). Por ejemplo, la glutatiónilación de la actina regula su función en los neutrófilos polimorfonucleares (Sakai et al., 2012). Además de estas modificaciones, un entorno oxidante también puede favorecer las uniones intra-inter proteína mediante la formación de puentes disulfuro entre dos grupos tioles de sus cisteínas. Por ejemplo, en la proteína Cdc25c, la oxidación favorece la formación de un puente disulfuro intra-proteína que regula su estabilidad (Savitsky and Finkel, 2002).

La oxidación de las proteínas debida a una situación de estrés oxidativo conlleva efectos perjudiciales o negativos para la célula. Se ha descrito que existe un aumento de la concentración de proteínas oxidadas en procesos como el cáncer o el envejecimiento (Yan et al., 1997). Por ejemplo en cáncer de mama se ha demostrado un aumento de su concentración en el microambiente tumoral (Mannello et al., 2009). Sin embargo, la oxidación de proteínas, en concreto la oxidación reversible de los grupos tiol de las cisteínas, pueden implicar también efectos positivos. En general, estos efectos están relacionados con la activación de ciertas vías de señalización que regulan las defensas antioxidantes. Es decir, los grupos tiol de los residuos de cisteínas podrían actuar como “sensores” de estrés oxidativo activando así la defensa antioxidante. Estos mecanismos son diversos y abarcan desde cambios en la actividad, abundancia, localización e interacción de las proteínas con otras biomoléculas (Wang et al., 2012).

## 5.4. DIETA, ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER.

Tal y como ya se ha descrito, el daño en ADN, proteínas y lípidos inducido por ROS juega un papel muy importante en el desarrollo y la progresión de numerosos procesos patológicos incluido el cáncer. El daño oxidativo en el material genómico puede resultar en una parada o estimulación del proceso de replicación, inducción de vías de transducción de señales, errores en la replicación o inestabilidad genómica (Cooke et al., 2003). Estas lesiones pueden ser reparadas o fijarse como mutaciones en el ADN colaborando así en la transformación de una célula sana en tumoral. 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 y la apoptosis (Zmijewski et al., 2005; Chiarugi and Fiaschi, 2007).

Alteraciones en las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, y en los antioxidantes no enzimáticos GSH, vitamina C y TRx, así como en vías de señalización relacionadas, son comunes en muchos tipos de cáncer (Valko et al., 2006; Oberley and Oberley, 1997) y, en particular, en cáncer de mama (Padmavathi et al., 2006). Una disminución de la capacidad antioxidante en las células tumorales 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 (Oltra et al., 2001; Oberley and Oberley, 1997). Sin embargo, también se ha descrito una correlación entre un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes y un peor pronóstico del cáncer, sugiriendo que dicho incremento protege a la célula de ser dañada por radicales libres y favorece la proliferación celular mediante la evasión de la apoptosis. La regulación de la apoptosis mediante el estado redox, promoviéndose proliferación en un medio reducido e induciéndose apoptosis en un estado de oxidación, es un mecanismo que podría favorecer o interferir en el proceso carcinogénico en sus diferentes etapas (Kinnula and Crapo, 2004; Nomura et al., 1999).

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 Se y los antioxidantes tiol, entre otros. Los antioxidantes se vienen utilizando ampliamente en la industria alimentaria como conservantes y estabilizantes, pero en los últimos años se han

añadido como suplemento buscando un fin beneficioso para la salud. Así, algunos estudios han demostrado los efectos sobre el estado redox de la célula de compuestos como los polifenoles del té negro, la fibra y sobretodo los diferentes tipos de ácidos grasos (Watson et al., 2000; Murugan et al., 2007). 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 CAT (Ruiz-Gutierrez et al., 1999). 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 (Domitrovic et al., 2006). En relación al aceite de oliva virgen, éste parece deber 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 (Ochoa-Herrera et al., 2001; Scaccini et al., 1992; Ruiz-Gutierrez et al., 1999). Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren la contribución del estrés oxidativo en un amplio rango de enfermedades y en este sentido, no han sido pocos los autores que han investigado la capacidad de los antioxidantes para prevenir enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares o degenerativas como el Alzheimer (Bjelakovic et al., 2007; Zhang et al., 2008; Sesso et al., 2008). Sin embargo, estos estudios no han obtenido resultados claros en pacientes. Mientras que algunos de ellos mostraban efectos beneficiosos, otros no mostraban ningún efecto, o incluso en algunos de ellos se obtenían resultados perjudiciales para la salud (Zhang et al., 2008; Sesso et al., 2008). Estas contradicciones en los resultados han dado lugar a la llamada “paradoja del estrés oxidativo” (Biswas, 2016; Halliwell, 2000; Halliwell, 2013; Reuter et al., 2010).

Diversos autores han tratado de explicar este tema con diferentes argumentos. Una de las teorías se basa en que en muchas ocasiones el estrés oxidativo asociado a una determinada enfermedad no es la causa, sino una de sus consecuencias y por ello, la administración de antioxidantes a un paciente sería inefectiva. Otros autores proponen que la inefectividad de los antioxidantes en muchas enfermedades estaría relacionada con la dosis administrada, la cual sería insuficiente para disminuir los niveles de estrés oxidativo en ciertos tejidos o tipos celulares, siendo así el antioxidante incapaz de alcanzar su diana (Murphy et al., 2011). Por otra parte,

algunos trabajos sugieren que los efectos beneficiosos que se obtienen con ciertos alimentos ricos en antioxidantes no serían debidos al antioxidante en sí, sino a otros componentes del alimento o a la interacción entre todos ellos. Por ejemplo, se ha descrito que una dieta rica en frutas y verduras disminuye el daño oxidativo en el ADN pero, sin embargo, la administración de vitamina C, E o  $\beta$ -caroteno no ha demostrado este efecto protector en muchos casos. (Prieme et al., 1997; Rehman et al., 1999; Podmore et al., 1998). Además, existen estudios que demuestran el efecto de compuestos antioxidantes *in vitro*, por ejemplo los polifenoles, pero muy pocos estudios demuestran estos mismos efectos *in vivo* (Halliwell et al., 2005). Incluso algunos autores defienden cierta capacidad pro-oxidante de estos compuestos. Así, se ha comprobado en estudios *in vitro*, que los polifenoles en medio de cultivo pueden oxidarse y dar lugar así, en parte, a un “escenario” ligeramente oxidante, que sería la causa del aumento de las defensas antioxidantes, y no sus capacidades antioxidantes intrínsecas (Halliwell, 2008b; Halliwell, 2008a). La vitamina C es otro compuesto al que se le atribuyen propiedades pro-oxidantes, ya que se ha comprobado, que en medio de cultivo, tras su oxidación, se produce  $H_2O_2$  (Clement et al., 2001). Sin embargo, estos efectos, lejos de ser perjudiciales se han asociado a una disminución del crecimiento de tumores de ovario, páncreas y glioblastoma en modelos *xenograft* de ratones (Chen et al., 2008). En este sentido, también se ha demostrado que los polifenoles pueden oxidarse en diferentes bebidas, como el té verde, y en la cavidad oral así como junto con otras sustancias, como carotenoides (Young and Lowe, 2001) o vitamina C (Porter, 1993).

Conviene tener en cuenta que debido a la diferente naturaleza química de los radicales libres, no todos actúan de la misma manera o producen el mismo daño. El  $\cdot OH$ , por ejemplo, es capaz de interactuar con la mayoría de las biomoléculas, al contrario que el  $O_2\cdot^-$ , que actúa de una manera más selectiva. De la misma manera, no existe un antioxidante universal, sino que cada uno actúa sobre unas dianas específicas y genera diferentes productos. Por ejemplo, la enzima antioxidante SOD disminuiría el  $O_2\cdot^-$ , pero sin embargo como producto de su catálisis se produciría un aumento de  $H_2O_2$ . La vitamina E debido a su naturaleza actuaría en las membranas biológicas, mientras que la vitamina C actúa en el medio intracelular y extracelular (Biswas, 2016).

Otro aspecto relevante es el momento de administración del antioxidante. Por ejemplo, en un estudio donde los animales eran expuestos al herbicida paraquat, el tratamiento con vitamina C antes de la exposición al herbicida ejercía un efecto protector, mientras que el mismo tratamiento después de la exposición al herbicida aumentaba el daño producido por éste (Kang et al., 1998). Además, recientemente, se han descrito efectos beneficiosos como resultado de situaciones de suave o débil estrés oxidativo (*mild oxidative stress*) ya que en ese caso los ROS actuarían como moléculas señaladoras induciendo vías de señalización que aumentarían las defensas antioxidantes celulares, por ejemplo los niveles de GSH (Reuter et al., 2010; Halliwell, 2013). Diversos autores defienden que aumentar las defensas endógenas antioxidantes, por ejemplo mediante el suplemento de sustancias pro-oxidantes, implicaría una mejor terapia que el consumo de grandes dosis de antioxidantes (Halliwell, 2012).

En relación a la carcinogénesis, muchos autores han tratado de explicar las discrepancias halladas entre los niveles de estrés oxidativo y la enfermedad para posibles tratamientos oncológicos. Últimamente, la mayoría de autores proponen un doble efecto de los radicales libres según la etapa de la carcinogénesis en la que actúen. Así, en etapas iniciales de la carcinogénesis, donde se dan lesiones premutagénicas, los antioxidantes podrían ejercer un efecto protector disminuyendo los ROS y evitando un mayor daño sobre el ADN. Sin embargo, en las etapas donde la célula ya ha sufrido una transformación tumoral irreversible, donde se da la progresión del tumor, los ROS serían clave en la activación de las vías específicas de señalización que desencadenan la apoptosis celular evitando así la supervivencia, proliferación y desarrollo del tumor. En esta etapa, los antioxidantes, lejos de ejercer un efecto protector, promoverían la progresión y desarrollo tumoral, ya que unos bajos niveles de ROS no serían suficientes para inducir la apoptosis celular. Así pues, algunos autores concluyen en que los antioxidantes ejercerían un efecto beneficioso o perjudicial dependiendo de las necesidades de ROS en cada momento celular (Abed et al., 2015; Liou and Storz, 2010).

Por otra parte los niveles de ROS o estrés oxidativo también se han relacionado con la resistencia al tratamiento de algunos cánceres. Niveles elevados de estrés oxidativo, así como una disminución en las defensas antioxidantes, sensibilizarían

las células tumorales al tratamiento (Abed et al., 2015). Sin embargo, niveles elevados de defensas antioxidantes estarían asociados generalmente a la resistencia al tratamiento. Así, algunos autores describen un papel negativo (*the dark side*) de NRF2 en la resistencia al tratamiento de algunos quimioterápicos. Se ha demostrado una fuerte correlación entre los niveles de NRF2 y la resistencia en tres líneas tumorales humanas (carcinoma de mama, de pulmón y neuroblastoma) al tratamiento con cisplatino, doxorubicina y etopósido (Wang et al., 2008). Además, la activación química de NRF2 mediante terbutil hidroquinona (tBHQ) aumentaría la resistencia de células de neuroblastoma al tratamiento (Wang et al., 2008). A partir de estos resultados, algunos autores han propuesto tratamientos oncológicos combinados con inhibidores de NRF2 (Wang et al., 2008; Ren et al., 2011; Abed et al., 2015). Además, se ha descrito que una sobreexpresión de la enzima GST junto con niveles medianamente elevados de GSH podrían disminuir los efectos de diferentes quimioterápicos, y en este sentido, diversos autores han desarrollado moléculas inhibidoras de GST (Sau et al., 2010).

## 6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos del grupo investigador han demostrado que las dietas ricas en PUFA n-6, como el aceite de maíz, ejercen un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria experimental, mientras que las dietas ricas en aceite de oliva virgen extra, con alto contenido en ácido oleico y compuestos bioactivos, podrían ejercer un efecto potencialmente protector. Los mecanismos a través de los cuales los lípidos de la dieta ejercen sus efectos moduladores no son completamente conocidos. Se han obtenido resultados que apoyan una acción compleja y pleiotrópica, como la influencia sobre la composición de la membrana celular, la expresión génica, las vías de señalización intracelular y el metabolismo de xenobióticos, entre otros.

La hipótesis en la que se basa el presente trabajo es la siguiente:

**Las dietas ricas en aceite de maíz y aceite de oliva virgen extra ejercen sus efectos moduladores diferenciales de la carcinogénesis mamaria experimental, en parte, mediante cambios en el estado de estrés oxidativo en el organismo. Estos cambios implican diferencias en la defensa antioxidante enzimática y no-enzimática, los niveles de peroxidación lipídica, el daño sobre el ADN y su reparación.**

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

- 1. Estudiar los efectos de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal y el estrés oxidativo en animales sanos.**
  - 1.1. Analizar la evolución ponderal y la masa corporal de los animales.
  - 1.2. Caracterizar el perfil de expresión de las enzimas antioxidantes CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR en hígado y en glándula mamaria.
  - 1.3. Analizar la defensa antioxidante enzimática en hígado.
    - 1.3.1. Determinar la expresión de las enzimas antioxidantes CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR, y la actividad CAT, SOD y GPX a lo largo del tiempo.

- 1.3.2. Determinar los niveles totales del factor de transcripción NRF2 así como su retención citoplasmática.
  - 1.4. Analizar la defensa antioxidante enzimática en la glándula mamaria, mediante el análisis de la expresión de las enzimas CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR a lo largo del tiempo.
  - 1.5. Analizar la defensa antioxidante no-enzimática, mediante la determinación de los parámetros del glutatión en plasma: glutatión total, su forma reducida (GSH), su forma oxidada (GSSG), así como las ratios GSH/ GSH<sub>total</sub> y GSH/GSSG.
  - 1.6. Determinar el grado de peroxidación lipídica en plasma, mediante el análisis de los niveles de MDA.
- 2. Estudiar los efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en la iniciación de la carcinogénesis mamaria experimental.**
- 2.1. Analizar la defensa antioxidante enzimática en hígado.
    - 2.1.1. Determinar la expresión de las enzimas antioxidantes CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR, y la actividad CAT, SOD y GPX.
    - 2.1.2. Determinar los niveles totales del factor de transcripción NRF2 así como su retención citoplasmática.
  - 2.2. Analizar la defensa antioxidante enzimática en la glándula mamaria, mediante el análisis de la expresión de las enzimas CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR.
  - 2.3. Analizar la defensa antioxidante no-enzimática, mediante la determinación de los parámetros del glutatión en plasma: glutatión total, GSH, GSSG, y las ratios GSH/ GSH<sub>total</sub> y GSH/GSSG.
  - 2.4. Analizar la expresión de la glutatión sintetasa (GSS), así como de la actividad GR en hígado.
  - 2.5. Determinar el daño oxidativo en macromoléculas.
    - 2.5.1. Analizar el grado de peroxidación lipídica en plasma, mediante los niveles de MDA.
    - 2.5.2. Analizar el daño oxidativo en proteínas plasmáticas.

2.5.3. Analizar el daño oxidativo y total en el ADN en la glándula mamaria, mediante los niveles de 8-OHdG y el ensayo Comet, respectivamente.

2.5.4. Analizar la expresión de las enzimas de reparación del ADN, OGG y PARP, en la glándula mamaria.

**3. Estudiar los efectos de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal, la carcinogénesis mamaria y el estrés oxidativo en animales adultos inducidos con el carcinógeno.**

3.1. Analizar la evolución ponderal y la masa corporal de los animales.

3.2. Evaluar los diferentes parámetros de estrés oxidativo.

3.2.1. Analizar la defensa antioxidante enzimática en hígado.

3.2.1.1. Determinar la expresión de las enzimas antioxidantes CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR, y la actividad CAT, SOD y GPX.

3.2.1.2. Determinar los niveles totales del factor de transcripción NRF2 así como su retención citoplasmática.

3.2.2. Analizar la defensa antioxidante enzimática en la glándula mamaria, mediante el análisis de la expresión de las enzimas CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR.

3.2.3. Analizar la defensa antioxidante no-enzimática, mediante el estudio de los parámetros del glutatión en plasma: glutatión total, GSH, GSSG, así como las ratios GSH/ GSHtotal y GSH/GSSG.

3.2.4. Determinar el daño oxidativo en macromoléculas.

3.2.4.1. Analizar el grado de peroxidación lipídica en plasma, mediante los niveles de MDA.

3.2.4.2. Analizar el daño oxidativo y total en el ADN en la glándula mamaria, mediante los niveles de 8-OHdG y el ensayo Comet, respectivamente.

3.2.4.3. Analizar la expresión de las enzimas de reparación del ADN, OGG y PARP en la glándula mamaria.

3.3. Estudiar la carcinogénesis mamaria experimental.

3.3.1. Analizar y cuantificar las estructuras proliferativas epiteliales de la glándula mamaria y evaluar su grado de densidad.

3.3.2. Analizar los parámetros clínicos de la carcinogénesis: tiempo de latencia, incidencia, contenido tumoral (contenido tumoral total y contenido tumoral medio) y volumen tumoral (volumen tumoral total, volumen medio por animal y volumen tumoral medio por tumor).

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



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

**MATERIALES Y MÉTODOS**

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



## 1. ENSAYOS BIOLÓGICOS

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

### 1.1. ANIMALES: CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES AMBIENTALES

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

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

### 1.2. DIETAS EXPERIMENTALES

En este trabajo se utilizaron tres dietas semisintéticas con la misma composición cualitativa pero distinto contenido lipídico: dieta control normolipídica m3, dieta hiperlipídica de aceite de maíz M20 (rica en ácido linoleico -18:2n-6-) y dieta

## *Material y métodos*

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 (Solanas et al., 2002b; Escrich et al., 1994a; Escrich et al., 1994b). Este aspecto es de gran relevancia dado que la dieta constituye la variable experimental más importante de los estudios sobre la influencia de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental. Para poder asegurar que los resultados obtenidos se deben específicamente a las variaciones de la dieta es imprescindible que ésta sea equilibrada para la rata y que no contenga sustancias que afecten la carcinogénesis mamaria. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 1, y en la Tabla 2 se indica la composición de los aceites utilizados.

Respecto al contenido calórico, el de la dieta m3 fue de 3,71 kcal/g (7,3% de las calorías procedentes de las grasas) y el de las dietas hiperlipídicas, m20 y MO20, de 4,56 kcal/g (39.5% procedente de las grasas). La dieta control contuvo un 3% de aceite de maíz (*w/w*), la hiperlipídica de aceite de maíz, un 20% de este mismo aceite, y la dieta hiperlipídica de aceite de oliva un 3% de aceite de maíz más un 17% de aceite de oliva virgen extra. En referencia a los carbohidratos, que se suplementaron en forma de dextrosa, en la dieta control constituyeron el 67,9% *w/w*- (73% de las calorías totales), mientras que en las hiperlipídicas constituyeron un 45,9% *w/w*- (40,3% de las calorías totales). Además, todas las dietas contuvieron un 20% de las calorías en forma de proteínas (dieta control: 18 g caseína /100 g de dieta; dietas hiperlipídicas: 23g caseína/100g de dieta). La celulosa, las sales y las vitaminas correspondieron respectivamente a un 5; 5,9; 0,24 % (*w/w*). Con el objetivo de mantener el metabolismo lipídico, las dietas fueron suplementadas con metionina (0.51% *w/w*- en la dieta control y 0.66% *w/w*- en las dietas hiperlipídicas), colina (1800 mg/kg de dieta) y ácido fólico (5 mg/kg de dieta).

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

	m3	M20	m020
<b>PROTEÍNAS</b>			
Caseína	18.0	23.0	23.0
<b>CARBOHIDRATOS</b>			
Dextrosa	67.9	45.9	45.9
<b>LÍPIDOS</b>			
Aceite	3g aceite de maíz	20g aceite de maíz	3g aceite de maíz 17g aceite de oliva virgen extra
<b>FIBRA</b>			
Celulosa	5	5	5
<b>SALES<sup>1</sup></b>			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6100000		
CaCO <sub>3</sub>	1.2322576		
CaHPO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	1.0630714		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0000000		
NaCl	0.8350000		
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> FeNH <sub>4</sub>	0.1130148		
MnSO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	0.0255000		
ZnCl	0.0072964		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0039294		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0002500		
KI	0.0000641		
TOTAL SALES	5.8903837	5.8903837	5.8903837
<b>VITAMINAS<sup>1</sup></b>			
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

<sup>1</sup>: La composición en sales y vitaminas detallada para la dieta m3 es común a todas las dietas experimentales utilizadas.

**Tabla 2. Composición en ácidos grasos (%) del aceite de maíz y del aceite de oliva virgen extra utilizados.**

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

Los componentes empleados y el material necesario para su preparación se describen a continuación. Las dietas fueron preparadas en tandas de 4 kg. A lo largo de todo el ensayo se elaboraron un total de 525 Kg de dieta.

**COMPONENTES:**

- Lípidos:
  - Aceite refinado de germen de maíz (ver composición en la Tabla 2).
  - Aceite de oliva virgen extra (ver composición en la Tabla 2).
  - El análisis de la composición de los aceites se llevó a cabo en el Instituto de la Grasa de Sevilla (IGS).
- Proteínas: Caseína láctica (J. Escuder S.L).
- Carbohidratos: Dextrosa (J. Escuder S.L.).
- Fibra: Celulosa comestible microcristalina -AVICEL PH 102- (J. Escuder S.L).

- Vitaminas:
  - Liposolubles: DL- $\alpha$ -tocoferol acetato (E), retinol acetato (A), fitomenadiona (K1) (J. Escuder S.L.); colecalciferol (D3) (Sigma-Aldrich, Química, S.A.).
  - Hidrosolubles: Bitartrato de colina, inositol, ácido ascórbico (C), ácido nicotínico, pantotenato cálcico, aneurina (B1), riboflavina (B2), clorhidrato de piridoxina (B6), ácido fólico, biotina, cobalamina (B12) (J. Escuder S.L.).
  - Minerales: Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ), carbonato cálcico ( $CaCO_3$ ), fosfato monocálcico ( $CaHPO_4$ ), sulfato magnésico monohidratado ( $MgSO_4 \cdot H_2O$ ), cloruro sódico (NaCl), citrato ferroso amoniacal ( $C_6H_5O_7FeNH_4$ ), sulfato de manganeso monohidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ), cloruro de zinc (ZnCl), sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), cloruro de cobalto hexahidratado ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ), yoduro potásico (KI) (J. Escuder S.L.).

**MATERIAL:**

- Balanza de precisión *Sartorius-Werke* GMBH (minerales y vitaminas); Balanza *Sartorius Universal* -precisión centésimas- (ingredientes mayoritarios); Batidora semiindustrial *Kenwood* A901 (mezcla de ingredientes minoritarios); Batidora industrial Vímar 15/351 (mezcla final).

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

### 1.3. INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS

**MATERIAL:**

- Carcinógeno: DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antraceno ó 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ó 1,4-dimetilbenzfenantreno) (Sigma-Aldrich Química, S.A.).
- Diluyente: aceite de maíz (densidad: 0.91908 g/mL).
- Otros: baño *Unitronic-320* (JP Selecta S.A.), agitador *Vibromatic-384* (JP Selecta S.A.), catéteres, jeringuillas.

## Material y métodos

La inducción carcinogénica se realizó según el método de *Huggins, C. et al* (Huggins et al., 1961b; Huggins et al., 1961a) modificado (Escrich, 1987a)[1299]. Este método provoca la aparición de tumores mamarios en la rata de características similares a los de los humanos (Escrich, 1987b; Costa et al., 2002). El DMBA se disolvió en aceite de maíz. Esta disolución se realizó en un baño a +40°C en agitación constante durante 24 horas y protegiendo el carcinógeno de la luz. Los procedimientos utilizados siguieron estrictamente normas GLP (*Good Laboratory Practices*).

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

### 1.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio estuvo integrado por 345 animales. El día posterior a su llegada (día 23-24 de edad de las ratas), 10 animales fueron sacrificados y el resto fueron distribuidos en 3 grupos experimentales: control (C), maíz (M) y oliva (O), de 100 animales cada uno. En todos los grupos, los animales recibieron lactancia materna desde su nacimiento hasta el destete, el día 22-23 de vida. A partir de ese día y hasta el final del ensayo se les administraron las distintas dietas experimentales: m3 para el grupo C, M20 para el grupo M y mO20 para el grupo O.

A 52 días, 10 animales de cada grupo fueron sacrificados y el resto divididos a su vez en dos subgrupos, animales inducidos y animales sanos (Figura 10). Los resultados obtenidos en este sacrificio proporcionaron información sobre la situación basal, pre-inducción, para cada una de las dietas experimentales. Los animales quedaron así distribuidos de la siguiente manera: grupos de animales

inducidos Ci, Mi y Oi, con 70 animales cada uno, y grupos de animales no inducidos o sanos Cs, Ms y Os, con 40 animales cada uno. A 53 días -día 0 del tiempo post-inducción-, los animales de los grupos Ci, Mi y Oi fueron inducidos con una dosis única de 10 mg de DMBA vehiculizado en 1 ml de aceite de maíz. Los animales de los grupos Cs, Ms y Os recibieron 1 mL del vehículo sin carcinógeno. Este diseño fue desarrollado específicamente, a partir de los resultados obtenidos en una serie experimental anterior, de forma que se pudiera estudiar el posible efecto de los lípidos de la dieta sobre el metabolismo del DMBA, especialmente en las primeras horas tras su administración. Los grupos de animales no inducidos o sanos cumplieron la doble función de actuar como controles de los grupos de animales a los que se administró el DMBA.

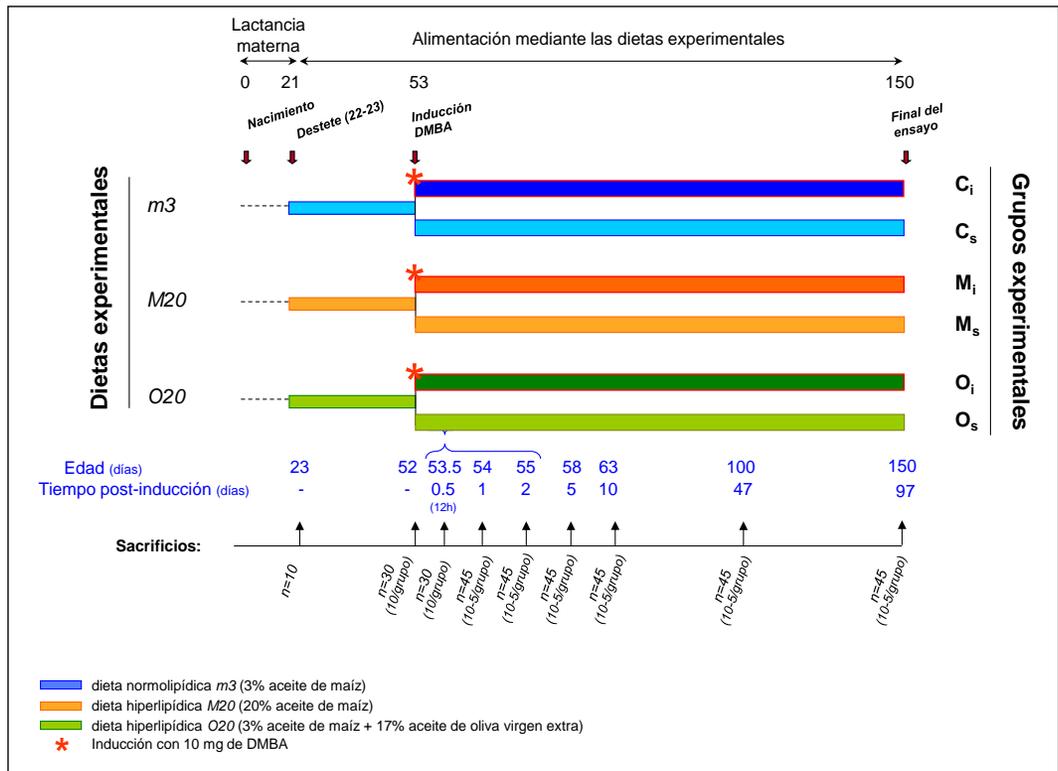


Figura 10. Diseño de la serie experimental.

A partir del destete, los animales fueron pesados e inspeccionados semanalmente. En los 53.5, 54, 55, 58, 63, 100 y 150 días (12, 24 y 48 horas, 5, 10,

## Material y métodos

47 y 97 días post-inducción, respectivamente) se sacrificaron 10 animales de cada grupo de animales inducidos (Ci, Mi y Oi) y 5 de los grupos de animales sanos, excepto en el sacrificio de 53.5 días (Cs, Ms y Os).

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

## 1.5. EXPLORACIONES PERIÓDICAS, SACRIFICIO Y NECROPSIA

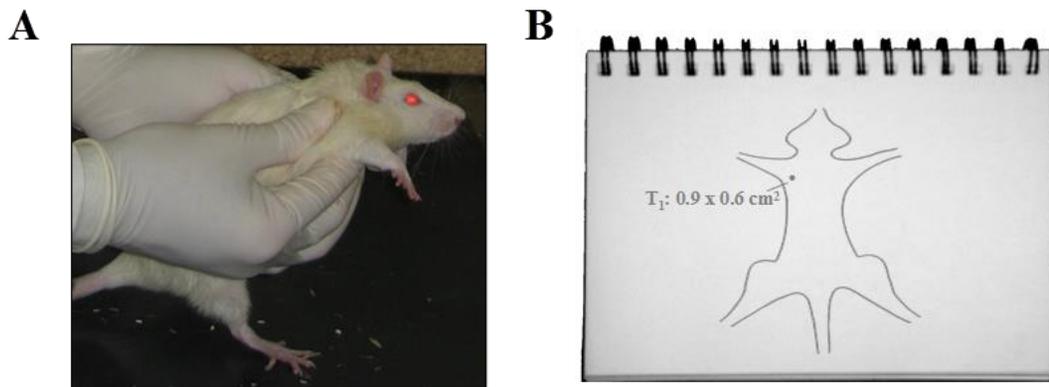
### MATERIAL:

- Balanza *Sartorius MC1* (Laboratory LC6200).
- Centrífuga *Centrosix Tabletop Centrifuge* (JP Selecta S.A.).
- Éter etílico, caja de anestesia.
- Formol al 4%.
- Equipo de anestesia inhalatoria.
- Guillotina, tijeras, bolsas de plástico cónicas con extremo distal abierto.
- Herramientas de disección.
- Microscopio *Laborlux 11* (Leitz).
- Suero fisiológico (ClNa 0.9%).
- Tampón fosfato salino (PBS -NaCl 0.137 mM, KCl 2.689 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 9.996 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.763 mM, pH 7.4-).
- Tubos K<sub>2</sub>EDTA, *Vacurette* (Greiner bio-one).

- Otros: algodón, embudos, gradillas, espátulas de algodón, portaobjetos, cubreobjetos, recipientes de cristal, pipetas *Pasteur*, jeringuillas y agujas, etc.

Tal como ya se ha mencionado, los animales fueron explorados semanalmente mediante inspección, palpación y determinación del peso corporal y de la longitud naso-anal. Estas exploraciones semanales permitieron: 1) el estudio de la evolución ponderal, 2) la detección, localización y determinación de los dos diámetros mayores de los nódulos tumorales, 3) efectuar el control de la calidad de las series, investigando la posible presencia de otras patologías, generales (Kohn and Clifford, 2002; Benirschke, 1978), o por desequilibrios nutricionales (Lindsey and Baker, 2006; Subcomitee on laboratory animal nutrition, 1978; Martínez de la Vistoria, 200) [827][905][5742]. Para el estudio del crecimiento se determinó la masa corporal de los animales utilizando el Índice de Lee, específico para rata [(peso corporal -g- )<sup>1/3</sup>/(longitud naso-anal -mm-) x 10000] (Ip et al., 1980), y el Índice de Masa Corporal [peso -g- /(longitud -cm-)²].

Por otro lado, las palpaciones comenzaron el día 71 de edad de los animales (18 días post-inducción). Éstas se realizaron de forma sistemática a fin de determinar la aparición, localización y el contenido tumoral. Asimismo, se midieron los dos diámetros mayores de cada tumor mediante un nonius para calcular el crecimiento tumoral a través del volumen estimado. Dichas palpaciones se realizaron sobre el animal colocado en posición anatómica normal, situado frente al operador y con la cabeza por delante. El animal se sujetaba suavemente con las dos manos y, simultáneamente, se le palpaban las zonas laterales longitudinales desde la base del cuello hasta la zona inguinal y alrededores de la cola. Además, se realizaba la misma operación a lo largo de la zona central y de ambos lados del cuello. El método de palpación consistió, básicamente, en pinzar los nódulos, a través de la piel, con el pulgar y el índice y, posteriormente, presionar a lo largo del cuerpo con el dedo plano a fin de descubrir las pequeñas irregularidades (Figura 11A). Los nódulos encontrados en cada exploración se emplazaron en un esquema corporal para cada una de las ratas (Figura 11B).



**Figura 11. Exploraciones periódicas de los animales.** (A) Imagen representativa de la palpación de una rata. (B) Esquema utilizado para la transcripción de los resultados de la exploración.

La eutanasia de los animales se realizó por anestesia con isoflurano y exanguinación mediante punción cardíaca. El isoflurano es un compuesto que no experimenta metabolismo hepático y no genera alteraciones en este tejido siendo, por tanto, válido para los estudios posteriores. Por otra parte, la extracción sanguínea por punción cardíaca permite extraer el máximo volumen de sangre sin provocar coagulación ni rotura de eritrocitos y células plasmáticas. Una vez realizadas estas maniobras se procedió a la decapitación troncomedular para trabajar simultáneamente con la cabeza y el resto del cuerpo del animal. Tras el sacrificio, se procedió a la limpieza exhaustiva de todo el material y a la ventilación de la sala antes de continuar con el siguiente animal (Yeh et al., 2006). El horario del sacrificio, la edad de los animales y la selección y el número de animales sacrificados por caja y día ya han sido indicados en el subapartado anterior. Con la máxima rapidez posible desde su obtención, la sangre se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma de los elementos formes. Ambas fases se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y tras su congelación los plasmas fueron transferidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En el caso de los sacrificios a 100 días y final, se procedió, paralelamente, a la exéresis de los tumores mamarios. De cada uno de ellos se determinaron los 3 diámetros mayores y se separó una parte representativa que fue fijada en formol al 4% para su posterior estudio anatomopatológico. El resto de la muestra tumoral se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En relación a las glándulas mamarias, se realizó la exéresis de las abdominales y torácicas del lado izquierdo y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su

almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estas glándulas se destinaron a estudios de biología molecular. Por otro lado, las glándulas contralaterales (derechas) así como un fragmento de hígado fueron fijados en formol al 4% para estudios histológicos. Además, a día 100 se recogieron 5 muestras por grupo de glándulas derechas abdominales y se conservaron en formol al 10% para el posterior estudio del *Whole Mount* (apartado 2.2.). Finalmente, se procedió al eviscerado del animal. Los tejidos se lavaron en suero fisiológico y rápidamente se congelaron en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La necropsia completa de los animales se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la guía de *Rowet* (Rowet, 1976).

## 2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

### MATERIAL:

- Lupa binocular (Olympus).
- Microscopio óptico *Nikon Eclipse E800*. Acoplado a los programas de captación de imágenes *ACT-1®* (Nikon) y *AnalySIS®* (Olympus).
- Otros: vitrina de gases, agitador, estufa, nevera a  $+4^{\circ}\text{C}$ , baño, portaobjetos, cubreobjetos, placas de *petri*, material de disección.

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

### 2.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES EXPERIMENTALES

El estudio histopatológico se realizó en colaboración con un médico especialista en anatomía patológica. Las muestras se fijaron en formol al 4%, y se incluyeron en parafina. Se practicaron varios cortes de cada muestra (de 1 a 3) de  $4\ \mu\text{m}$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina. El diagnóstico de las biopsias tumorales se basó esencialmente en los criterios de *Young S. y Hallows R.C.* (Young and Hallows, 1973).

Además del diagnóstico histopatológico de las lesiones, se analizó el grado arquitectural y nuclear de los adenocarcinomas así como el número de mitosis en 10 campos de gran aumento (400X). Con dicha información se valoró el grado

histológico, basado en el método de *Scarff-Bloom-Richardson* (SBR), utilizado en carcinomas de mama humanos, adaptado a la rata previamente por el equipo investigador (Costa et al., 2002).

## **2.2. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA. WHOLE MOUNT.**

La caracterización morfológica de la glándula mamaria se realizó mediante el análisis de preparaciones completas (*Whole Mount*) (Brown and Lamartiniere, 1995). Se disecaron las glándulas mamarias derechas de 5 animales por grupo a día 100. La piel de la rata con la glándula mamaria se sumergió durante 48 horas en formol al 10% para fijar el tejido. Se separaron las glándulas de la piel y se incubaron en acetona durante 48 horas en agitación para eliminar el tejido adiposo. Tras eliminar los restos de acetona con etanol al 70%, las glándulas se hidrataron en agua destilada durante 15 minutos en agitación. Inmediatamente después, se tiñeron con una solución de carmín de aluminio (carmín 2 g/L, sulfato de aluminio y potasio - $\text{AlKSO}_4$ - 5 g/L) y, posteriormente, se deshidrataron en una serie de alcoholes de graduación creciente (etanol 35, 50, 70, 95 y 100%). Finalmente, las glándulas se mantuvieron en una solución limpiadora (*Histochoice*, Sigma-Aldrich Química, S.A.) hasta el momento del montaje en medio *Clarion™ Mounting Medium* (Sigma). Antes de realizar el montaje de las glándulas mamarias, se eliminó el tejido conjuntivo y muscular bajo una lupa binocular. Se determinó el número de estructuras epiteliales normales: TEB, TD, AB y lóbulos tipo 1, 2 y 3. Se analizaron 10-15 campos de gran aumento (1 campo 40X  $\equiv$  3.77 mm<sup>2</sup>) por glándula mamaria. Las estructuras se contaron en el margen externo de la glándula, que es el área con mayor actividad de crecimiento, y se identificaron siguiendo los criterios previamente establecidos por *Russo y Russo* (Russo and Russo, 1996a). Además, se determinó el número de estructuras neoplásicas: hiperplasias (H), proliferaciones intra-ductolobulillares (PIDL) tipo 1 y 2, y tumores (T). Se utilizó un microscopio óptico de campo claro (Nikon) acoplado a un sistema de captación de imagen y al programa de análisis ACT-1.

Por otro lado, se llevó a cabo la categorización cualitativa de las glándulas mamarias en 7 categorías de menor a mayor grado de densidad. A su vez, estas categorías se agruparon en cuatro clases con el fin de facilitar el análisis estadístico cualitativo: clase I (categoría 1), clase II (categorías 1.5 y 2), clase III (categorías 2.5 y 3) y clase IV (categorías 3.5 y 4). La clasificación de las glándulas mamarias se realizó bajo el microscopio por dos investigadores independientes.

### 3. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

#### MATERIAL:

- Autoclave *SterilClav-75 Dry* (Raypa).
- Cabina de Flujo Laminar Vertical *FLV60* (EURO AIRE - Tecnología para Diagnóstico e Investigación s.a.).
- Centrífuga *5415R* (*Eppendorf*).
- Centrífuga refrigerada *Sorvall®RC-6* (DuPont Instruments).
- Ultracentrífuga *Sorvall™ WX*, rotor 70.1-Ti.
- Sonicador *Ultrasonic Homogenizer 3000* (Biologics, INC).
- Brazo del sonicador *Titanium Micro Tip*, 0-120-0005 (Biologics, INC).
- Equipo de homogenización de tejidos *Polytron* (Kinematica).
- Equipo de *Real Time-PCR MyiQ5-iCycle* (Bio-rad Laboratories).
- Espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific).
- Espectrofotómetro *UV-VIS 3000* (Cecil®).
- Lector de placas *NanoQuant infinite M200* y programa *Tecan i-control 1.6* (Tecan).
- Microcentrífuga *Microfuga™ 11* (Beckman).
- Sistema de captura de imágenes en tiempo real *Gel Doc 2000* (BioRad) acoplado al programa de análisis de imagen *Quantity One™* (BioRad).
- Termociclador *Techne* (Progene).
- Unidad de electroforesis *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (BioRad).
- Unidad de transferencia electroforética *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad).

## Material y métodos

- *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (BioRad).
- *ChemiDoc™ XRS+* acoplado al programa informático *Image Lab™ Software* version 5.1 (BioRad).
- *ImageQuant™ LAS 4000* junto con el programa *ImageJ*.
- Equipo de Cromatografía líquida de alta Eficacia (CLAE) *Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™3000* compuesto por:
  - o Bomba *LPG-3400A*.
  - o Autoinyector *WPS-3000TSL*.
  - o Detector *VWD-3400*.
  - o Ordenador *IBM XT 486* con el programa de integración *CLASSLC10*.
  - o Columna de fase reversa *Thermo Scientific™ Hypersil GOLD C18* cuyas dimensiones son 15 x 4.6 mm y de un tamaño de partícula de 5 µm.
- Otro material: Congelador de -80°C *Ultima II* (REVCO), combinado de nevera de +4°C y congelador de -20°C (Liebherr), agitadores magnéticos y orbitales, vórtex, contenedores de nitrógeno líquido, máquina de hielo, estufas, balanzas de precisión, baños con control de temperatura, cubetas de electroforesis horizontales, bandejas 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.

### 3.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL

La manipulación de ARN requirió la adopción de una serie de precauciones a fin de evitar su degradación por la actividad de las ribonucleasas (RNAsas), tanto de origen endógeno (de la propia muestra) como exógeno (contaminación por parte de los investigadores, de las soluciones y/o del material).

Para conseguir y mantener un ambiente libre de RNAsas (*RNasa-free*) se procedió del siguiente modo:

- Se trabajó siempre con guantes y éstos fueron sustituidos frecuentemente.
- Los reactivos y el material para la manipulación del ARN fueron marcados y guardados por separado.

- El material metálico y de vidrio se trató con calor incubándolo a +200°C durante toda la noche (12-14 horas).
- Las superficies de trabajo y las pipetas automáticas utilizadas fueron tratadas con solución inhibidora de RNAsas (*RNasa Away* -Molecular BioProducts-).

La extracción de ARN total a partir de muestras de hígado se realizó siguiendo el procedimiento del kit *RNeasy Tissue* (Qiagen), basado en la unión del ARN a una membrana de partículas de sílice en presencia de una elevada concentración de sales. Se pesaron 30 mg de tejido hepático pulverizado en un tampón desnaturizante que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol y tiocianato de guanidina para inactivar las RNAsas, asegurando así una buena purificación de ARN intacto. Se utilizó un *Polytron* (Kinematica®) para la homogenización del tejido. Tras una centrifugación de 3 minutos a máxima velocidad, el ARN quedó en la fase acuosa mientras que el ADN y las proteínas quedaron retenidos en la interfase y en la fase orgánica. A la fase acuosa se le añadieron 550  $\mu$ L de etanol 70% y de esta mezcla se transfirió un volumen de 700  $\mu$ L a una membrana de sílice y se lavó con diferentes soluciones provistas por el kit. Finalmente, el ARN se recuperó por elución con H<sub>2</sub>O 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 mismo kit que para el tejido hepático adaptado para tejidos con un elevado contenido lipídico. Se pesaron 50 mg de tejido mamario pulverizado en 1 mL de *Quiazol Lysis Reagent* (Qiagen) y se procedió a la homogeneización de la muestra al igual que en el tejido hepático. Este homogenado se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Durante este tiempo se promovió la disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación la muestra quedó separada en 3 fases: una superior incolora y acuosa que contenía el ARN; una interfase blanca; y una inferior roja, orgánica. Se transfirieron 600  $\mu$ L de la fase acuosa a un *ependorf* y se le añadieron 600  $\mu$ L de etanol. El homogenado se transfirió a una membrana de sílice y se extrajo el ARN según se ha descrito para el tejido hepático.

## Material y métodos

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

### 3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL

Para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de glándula mamaria se utilizó el kit *SpeedTools Tissue DNA Extraction* (Biotools). El fundamento del kit se basa en un sistema de unión del ADN a una membrana de partículas de sílice.

Se realizó una pre-lisis de una porción de 25 mg de glándula mamaria con proteinasa K y SDS, previamente homogeneizada manualmente con émbolo, a +56°C durante 16 horas. Seguidamente, se realizó una lisis mediante hidrocloreuro de guanidina a +70°C durante 10 minutos. El ADN se unió a la membrana de la columna, posteriormente fue 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 µl de muestra utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific). La pureza de los ácidos nucleicos fue determinada por espectrofotometría mediante la relación de las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 nm al igual que en el caso del ARN.

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

La PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa, es un método donde la amplificación y cuantificación del ADN se producen de forma simultánea. Dicha técnica fue empleada para cuantificar el ARN mensajero a partir de las muestras de ADN complementario (ADNc), el cual se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total utilizando el sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem). Las muestras fueron incubadas con 10 µL 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/ $\mu$ L y posteriormente almacenado a -20°C.

Para el análisis de expresión de genes en glándula mamaria e hígado se utilizó la metodología *TaqMan*® *Gene Expression Assays* (Applied Biosystem). 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 amplificaron 25 ng de ADNc utilizando la mezcla de reactivos *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystem) y el ensayo *TaqMan*® apropiados en un volumen final de 25 $\mu$ L. Cada ensayo contiene los *primers* y una sonda marcada fluorescentemente, específica para el gen de estudio. Las características de cada ensayo *TaqMan*® utilizado se encuentran detalladas en la Tabla 3. Todas las muestras fueron amplificadas por duplicado en un equipo *MylQ-iCycler* (BioRad Laboratories) con el siguiente programa: 1 ciclo de +95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos de +95°C durante 15 segundos y +60°C durante 60 segundos. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (sin ADNc).

La cuantificación de los genes de interés de cada muestra se realizó durante la fase exponencial de amplificación. Así, se determinó un umbral en dicha fase exponencial y se obtuvo el número de ciclo en el cual la fluorescencia de cada muestra superó el valor umbral (*Ct -Cycle threshold-*). Los valores obtenidos para cada muestra se normalizaron en relación al transcrito control *Hprt1*. Para cada muestra se calculó la diferencia entre el *Ct* del gen problema y el del control ( $\Delta$ *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 3. Ensayos *TaqMan*® utilizados en el estudio de la expresión génica mediante *Real Time-PCR*.**

Símbolo del gen	Nombre del gen	Ref. <i>TaqMan</i> ®
Cat	Catalase	Rn00560930_m1
GPx1	glutathione peroxidase 1	Rn00577994_g1
GPx4	glutathione peroxidase 4	Rn00820818_g1
Gsr	glutathione reductase	Rn01482159_m1
GSS	glutathione synthetase	Rn00564188_m1
Sod1	superoxide dismutase 1, soluble	Rn00566938_m1
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Rn00477784_m1
Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Rn01527840_m1
Ogg1	8-oxoguanine DNA glycosylase 1	Rn00578409_m1
Parp1	poly (ADP-ribose) polymerase 1	Rn0056518_m1

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

### 3.4. OBTENCION DE EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES

Se obtuvieron extractos proteicos totales a partir de muestras de hígado conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  mediante el método de *Wydert J.C.* y *Cullen J.J.* (*Weydert and Cullen, 2010b*) modificado. Se pesaron 50 mg de tejido directamente en un tubo *eppendorf* conteniendo 250  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato de potasio 50mM pH 7,8. Este tampón es recomendable para ensayos de actividad ya que no contiene ningún componente que pueda interferir. Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido o nieve carbónica para evitar su descongelación antes de introducir las en el *eppendorf* y todo el procedimiento posterior se realizó a una temperatura de entre 0 y  $+4^{\circ}\text{C}$ .

La homogeneización de las muestras se realizó en primer lugar de forma manual mediante la utilización de un émbolo de plástico directamente en los tubos *eppendorf* mantenidos en hielo y, a continuación, mediante sonicación utilizando un sonicador para muestras de punta o varilla de titanio (*Ultrasonic Homogenizer 3000*)

con un diámetro de brazo de 3.8 mm (*Titanium Micro Tip*). El proceso de sonicación (siempre en frío) constó de tres fases:

- Primera sonicación de 10 segundos a potencia 40.
- Segunda sonicación de 10 segundos a potencia 40.
- Tercera sonicación de 10 segundos a potencia 40.

Para evitar el posible deterioro de las muestras debido al calor producido durante la sonicación, el proceso se realizó por tandas. Se sonicó la primera de las muestras y se dejó enfriar en hielo mientras se realizó la primera sonicación al resto de muestras. Se continuó de esta forma para la segunda y tercera sonicación, siguiendo siempre el mismo orden de sonificado de las muestras. De esta forma, las muestras se enfriaron entre una sonicación y la siguiente. Para evitar la contaminación entre muestras, la varilla del sonicador se limpió rociándola con etanol al 70% antes de utilizar el aparato, después de sonicar cada muestra y al acabar. Los tiempos y potencia de sonicación fueron optimizados para la cantidad de tejido utilizada.

Una vez finalizado el proceso de extracción, los extractos proteicos fueron diluidos en 10 volúmenes de tampón fosfato ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) 50 mM y se procedió a su cuantificación. Para ello se utilizó el kit *DC Protein Assay II* (Bio-Rad) y un estándar comercial (*Bovine Serum Albumin-BSA- Standard Set* Bio-Rad). Este ensayo se realizó en microplaca y para ello a 5  $\mu$ L de cada muestra y estándares se les añadieron 25  $\mu$ L del reactivo A y 200  $\mu$ L del reactivo B. Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y pasado este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia a 750 nm. A partir de los valores de las absorbancias de la recta patrón se pudo calcular la concentración de proteínas de las muestras. Los extractos proteicos diluidos se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **3.5. ANALISIS DE LOS NIVELES DE PROTEINA. WESTERN BLOT.**

Los extractos proteicos totales de hígado fueron utilizados para determinar los niveles de la proteína NRF2. Para ello, los extractos fueron diluidos a las concentraciones que se estandarizaron adecuadas para el ensayo y se procedió a desnaturalizar las muestras mediante la adición del tampón *Laemli* (BioRad) con  $\beta$ -mercapto-etanol ( $\beta$ ME) al 5% en proporción 1:1. El  $\beta$ ME fue utilizado como agente

## Material y métodos

reductor y provocó la rotura de los puentes disulfuro de las proteínas. Posteriormente, las muestras fueron calentadas a +90-+100°C durante 4 minutos. Una vez las proteínas se encontraron desnaturalizadas y en su estructura primaria se procedió a la electroforesis. Para ello se cargaron 40 µg de proteína de cada muestra en geles comerciales *Mini-Protean® TGX Stain-Free™ Precast Gels* (BioRad) y se les aplicó un campo eléctrico a voltaje constante de 200V durante 45 min en tampón Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a temperatura ambiente. Las proteínas cargadas negativamente se desplazaron por el gel hacia el polo positivo en función de su carga y masa molecular. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF proporcionada por el paquete comercial *Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack* (BioRad). La transferencia se realizó en el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (BioRad) durante 10 minutos a 2.5V y 1.3 mA.

A continuación la membrana fue incubada en tampón de bloqueo con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T 0.1% (20 mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 1 % Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo primario NRF2 de conejo (Abcam) a una concentración de 1:2000 en tampón de bloqueo durante 16 horas a +4°C en agitación. Tras realizar tres lavados en TBS-T 0.1% durante 12 minutos cada uno en agitación, la membrana se incubó con la solución de anticuerpo secundario de anti-conejo (SIGMA Aldrich) conjugado a peroxidasa de rábano en tampón de bloqueo a una concentración de 1:5000 durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, tras realizar lavados con TBS-T 0.1%, las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia, mediante el sistema *Luminata™ Forte Western HRP Substrate* (Millipore). La fluorescencia fue analizada con el sistema *ChemiDoc™ XRS+* acoplado al programa informático *Image Lab™ Software version 5.1* (BioRad). El contenido proteico se determinó mediante el sistema *Image Lab™ Software* y los valores fueron relativizados a la cantidad real de proteína en cada pocillo determinada gracias al sistema de los geles *TGX Stain-Free™*.

### 3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A partir de los extractos de proteína obtenidos en hígado se realizaron los ensayos de actividad enzimática CAT, GPX, SOD y GR. Las muestras procedieron de los todos los sacrificios en los ensayos de CAT, GPX y SOD. Para los ensayos de GR se utilizaron muestras de 52 y 55 días.

Todos los ensayos de actividad se llevaron a cabo bajo condiciones de alta precisión, utilizando agua ultrapura (*H<sub>2</sub>O Molecular Biology Reagent*, Sigma-Aldrich) y otros reactivos estériles. Los extractos proteicos para poder ser utilizados en ensayos de actividad deben de ser frescos, con menos de 90 días desde su extracción hasta su utilización. Debido a ello, se coordinó la extracción proteica de las 360 muestras de hígado para posteriormente determinar su actividad mediante los ensayos enzimáticos correspondientes.

#### - ACTIVIDAD CATALASA

El ensayo de actividad del enzima CAT se basó en el protocolo de *Weydert y Cullen* (Weydert and Cullen, 2010b) adaptado a microplaca. La catalasa utiliza el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como sustrato para transformarlo en dos moléculas de agua y una molécula de oxígeno como productor de la reacción. El  $H_2O_2$  es un compuesto que absorbe luz a una determinada longitud de onda (240 nm). Este hecho permite la medida de su desaparición a lo largo del tiempo, que será directamente proporcional a la actividad catalasa.



Para cada muestra se rellenaron un total de 4 pocillos por placa, 2 pocillos correspondientes a la muestra y otros 2 a su respectivo blanco. La placa quedó dividida en dos mitades: en una de ellas, las muestras (por duplicado) contenían todos los componentes para llevar a cabo la reacción incluido el  $H_2O_2$ ; en la otra, las mismas muestras contenían los mismos componentes a excepción del sustrato, el  $H_2O_2$  (Figura 12). El número máximo de muestras que se procesaron por placa fue de 23. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano

## Material y métodos

(Greiner Bio-one UV-Star 96 well plates, Fisher Scientific) El número máximo de muestras por placa fue de 23.

Para cada muestra se prepararon 704  $\mu\text{L}$  de una concentración de 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en tampón fosfato 50 mM pH 7,8 y se mantuvieron a 4°C. Además, se prepararon las soluciones de trabajo necesarias de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30mM a partir de una solución comercial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (w/w), y una solución de catalasa como control positivo del ensayo de 400U/mL a partir de una solución comercial de 10000-40000U/mg, 34mg. Esta solución se alicuotó y se conservó a -20°C. La solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30mM se preparó para cada ensayo y después de su preparación se mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz para asegurar su estabilidad dada su baja concentración.

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

Figura 12. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad CAT. C+: Control positivo.

Posteriormente, se cargaron 4  $\mu\text{g}$  de proteína de cada muestra y de la solución de control positivo por pocillo en un volumen de 160  $\mu\text{L}$  (Figura 12). Para cada muestra problema, en dos pocillos se llevó a cabo la reacción completa y en otros dos no se dio debido a la falta del sustrato de la reacción. A continuación, se introdujo la placa en el lector (*NanoQuant infinite M200*) y se inició el programa previamente diseñado. Cuando se alcanzaron los +25°C la placa fue expulsada y en todos los pocillos de la mitad izquierda de la placa se cargaron, con la mayor rapidez posible,

80  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30mM mediante una pipeta multicanal, mientras en la mitad derecha de la placa se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de la solución de tampón fosfato 50mM, resultando así un volumen final en cada pocillo de 240  $\mu\text{L}$ . Justo después se iniciaron las lecturas de absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante 2 minutos. La cinética de la reacción se calculó de la siguiente forma:

1) La disminución de absorbancia a lo largo del tiempo es directamente proporcional a la actividad catalasa. Se representó así la linealidad de la reacción en función del tiempo a partir de las medias de los duplicados.

2) Se calculó la diferencia de absorbancia, en valor absoluto, para cada tiempo entre los valores de las muestras con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y sin  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se utilizaron estos valores para el resto de cálculos.

3) Se calculó la disminución de absorbancia en función del tiempo para cada muestra en el rango lineal de la función (1 min) usando la siguiente ecuación:

$$K = (A_1 - A_2) / 60$$

donde: K=unidades de actividad,  $\text{s}^{-1}$ ;  $A_1$ = valor de absorbancia a tiempo 0;  $A_2$ = valor de absorbancia a tiempo 60 segundos.

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

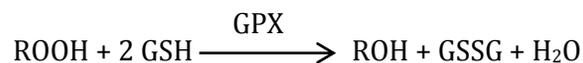
- El número de puntos de la región lineal de la gráfica representada para cada muestra debió de ser de al menos 5.
- El coeficiente de variación de los valores de los duplicados para cada medida a lo largo del tiempo debió de ser inferior al 15%. Se aceptaron valores de CV% por debajo del 20% si fue solamente un punto de la región lineal de la recta el que presentó este valor elevado.
- Se repitió el ensayo para aquellas muestras que no cumplieron todos estos requisitos.

#### - ACTIVIDAD GPX

El ensayo de actividad de la GPx se basó en el protocolo de *Weydert y Cullen* (Weydert and Cullen, 2010b) adaptado a microplaca. La reacción global del ensayo está acoplada a un sistema regenerador del GSH basado en la GR, que utiliza el NADPH como dador de electrones (Rahman et al., 2007). El NADH absorbe luz a 340nm, de manera que la disminución de absorbancia a esta longitud de onda será

## Material y métodos

directamente proporcional a la actividad GR, que a su vez será proporcional a la actividad GPX.



El ensayo se realizó con cada muestra por duplicado y con un blanco para todas ellas, además de un control positivo de reacción. Previamente se estandarizó la cantidad de proteína por pocillo a 25 µg. El número máximo de muestras que se procesaron por placa fue de 46 (Figura 13). Se utilizaron microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Fisher Scientific).

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

**Figura 13. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad GPx.**  
B: Blanco; C+: control positivo.

Se preparó una solución de tampón fosfato de potasio 55.6 mM conteniendo 1.1 mM de EDTA y 1.1 mM de acida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ). Este reactivo se utilizó para inhibir la posible actividad catalasa de la muestra ya que esta enzima también utiliza el mismo sustrato que la GPX ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A partir de 50 mL de este tampón fosfato se preparó una solución de trabajo que contenía 1.33U/mL de una solución comercial

de GR y 1.33mM de GSH. Esta solución se preparó para cada una de las placas de manera que siempre se mantuvo fresca y nunca se usó después de 6h desde su preparación. Además, se preparó una solución 4 mM de NADPH a partir de un reactivo comercial de NADPH (Sigma). Debido a su gran facilidad de oxidación se diluyó todo el reactivo a la concentración adecuada y se guardó bajo oscuridad. La solución no se usó más de 6 horas después de ser preparada. Como sustrato de la reacción se preparó una dilución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5 mM en agua ultrapura a partir de una solución comercial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% w/w. Siguiendo las indicaciones del método, se comprobó que la absorbancia de esta solución a 240 nm estaba alrededor de 0.099. Para el control positivo se preparó una solución de GPx de 1U/mL que se estandarizó previamente.

En cada pocillo se añadieron 160 µL de la solución de trabajo de GPX 12 µL de la solución de NADPH y 24 µL de cada muestra (equivalente a 25 µg de proteína). La placa se incubó durante 5 minutos en el lector a +37°C. Tras esta incubación la placa fue expulsada del lector y se añadieron 24 µL de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada pocillo. Se realizaron lecturas continuadas cada 30 segundos durante 4 minutos. A cada muestra se le restó el valor del blanco al correspondiente tiempo. La cinética de la reacción se calculó de la siguiente forma:

1) La disminución de absorbancia a lo largo del tiempo es directamente proporcional a la actividad GPx. Se representó así la linealidad de la reacción en función del tiempo.

2) Se restó la media de los valores del control negativo a la media de los valores para cada muestra. Se utilizaron estos nuevos valores para el resto de los cálculos.

3) Para cada muestra se representaron los valores de absorbancia a lo largo del tiempo.

4) Se calculó el cambio en absorbancia ( $\Delta A_{340}$ )/minuto en el rango lineal de la función, para cada muestra usando la siguiente ecuación:

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

5) La actividad específica de GPX se determinó con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} = \frac{\Delta A_{340}/\Delta t \cdot 2\mu\text{mol}}{\varepsilon \cdot L \cdot E \cdot 1\mu\text{mol NADPH}}$$

donde:  $\varepsilon$ = coeficiente de extinción molar del NADPH ( $6.22\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}$ ); L= diámetro del pocillo; y E= concentración total de proteína.

Los criterios establecidos para aceptar los resultados obtenidos o repetir la muestra fueron los mismos que para la actividad CAT.

#### - ACTIVIDAD GR

La enzima GR cataliza la reacción que regenera el GSSG reduciéndolo y transformándolo en dos moléculas de GSH. El GSH reacciona con el ácido ditionitrobenzoico (DTNB) i genera  $\text{TNB}^{2-}$ , un compuesto coloreado que absorbe luz a 405 nm. La actividad de la GR será directamente proporcional al incremento de absorbancia a esta longitud de onda. El ensayo se llevó a cabo mediante el kit *Glutathione Reductase (GR) Assay kit ab83461* (abcam).

Las muestras se ensayaron por duplicado. Cada placa contenía una recta patrón de TNB a diferentes concentraciones, por duplicado, así como un blanco por duplicado (Figura 14).

En las muestras problema fue necesario la previa eliminación de todo el GSH existente para así después determinar exclusivamente la producción de GSH debida a la actividad GR. Para ello, a 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra se les añadió 2,5  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% y tras agitación se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadieron 2,5  $\mu\text{L}$  de catalasa, se agitó y se incubó durante 5 min.

La recta patrón incluyó las siguientes concentraciones de TNB en tampón *Assay*: 10, 20, 30, 40 y 50nmol. De cada una de estas soluciones se añadieron 100  $\mu\text{L}$  en los pocillos correspondientes a la recta patrón. Las muestras problema fueron diluidas en tampón *Assay* a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . De esta dilución se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra o control positivo en los correspondientes pocillos (equivalente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína). Se preparó una mezcla de reacción de la cual se añadieron 50  $\mu\text{L}$  exclusivamente en los pocillos de las muestras y del control positivo. Rápidamente se introdujo la placa en el lector de placas *NanoQuant infinite*

M200 y se efectuaron lecturas continuadas a 405 nm cada minuto durante 10 minutos a temperatura ambiente. Con los datos de lectura obtenidos se estableció la cinética de la reacción de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	m3	m3	m11	m11	m19	m19	m27	m27	m35	m35
B	10	10	m4	m4	m12	m12	m20	m20	m28	m28	m36	m36
C	20	20	m5	m5	m13	m13	m21	m21	m29	m29	m37	m37
D	30	30	m6	m6	m14	m14	m22	m22	m30	m30	m38	m38
E	40	40	m7	m7	m15	m15	m23	m23	m31	m31	m39	m39
F	50	50	m8	m8	m16	m16	m24	m24	m32	m32	m40	m40
G	m1	m1	m9	m9	m17	m17	m25	m25	m33	m33	m41	m41
H	m2	m2	m10	m10	m18	m18	m26	m26	m34	m34	C +	C +

**Figura 14. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad GR.** m: Muestra; C+: control positivo; 0 a 50: nM de TNB.

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

2) Se restó el valor de absorbancia de cada minuto del blanco (*background*) a la correspondiente medida de fluorescencia a 405nm de cada muestra.

3) Se representó la recta patrón como concentración de TNB (nM) frente absorbancia, y se hicieron los cálculos de regresión lineal para obtener los valores de los coeficientes de Intercepción y Variable X (Pendiente) ( $y = \text{Intercepción} + ax$ ;  $y = ax + b$ ). A partir de los datos de la recta patrón se obtuvo una función que permitió interpolar la concentración de TNB formado en cada punto de cada muestra problema:  $\text{nmol TNB} = (\text{Valor Fluorescencia} - b) / ax$

4) Se representaron los valores de absorbancia de cada muestra respecto al tiempo y se calculó el incremento de absorbancia para cada muestra entre dos tiempos dentro de un tramo lineal de la reacción, siendo éste el mismo para todas

las muestras. Este valor de absorbancia se interpoló en la recta patrón calculándose así una cantidad de TNB (nmol) para cada muestra problema. A partir de estos valores se calculó la actividad de cada muestra de la siguiente manera:

$$\text{nmol/min/mL} = \frac{\text{nmol TNB}}{t (\text{min}) \cdot V}$$

donde: nmol TNB=cantidad de TNB calculada por la recta patrón a partir del incremento de absorbancia; t= rango de tiempo en el tramo lineal; y V= volumen de la muestra.

Los criterios establecidos para aceptar los resultados obtenidos o repetir la muestra fueron los mismos que para el resto de ensayos de actividad.

#### - ACTIVIDAD SOD

Esta actividad se calculó mediante el *kit SOD determination* (SIGMA). La enzima SOD cataliza la dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$  convirtiéndolo en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ , indispensable para la formación del compuesto *(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt* (WST-1). Este compuesto es capaz de absorber luz a 440 nm (Figura 15). La actividad SOD se calcula como el porcentaje de inhibición de la formación de WST-1. La actividad SOD será por tanto proporcional a la disminución de la absorbancia a 440 nm.

Cada muestra se analizó por duplicado y contó con 3 blancos diferentes. Las muestras se diluyeron en tampón *Dilution* hasta un volumen final de 88  $\mu\text{L}$  y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de dicha dilución en cada pocillo (equivalente a 5  $\mu\text{g}$  de proteína). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepararon las soluciones de trabajo *WST Working Solution* (WST) y *Enzyme Working Solution* (EWS) y se fueron añadiendo en la placa según el esquema siguiente (Figura 16, Tabla 4). La placa se dividió en dos mitades, una para los pocillos correspondientes a las muestras (mitad derecha) y otra para el Blanco 2 (mitad izquierda). En los pocillos reservados para las muestras se añadieron además 20  $\mu\text{L}$  de EWS a diferencia de los pocillos del Blanco 2 donde se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de tampón *Dilution*. A todos los pocillos de la placa se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la solución WST. En cada una de las dos mitades de la

placa se establecieron dos pocillos como Blanco 1 y Blanco 3 que se llenaron con 20  $\mu\text{L}$  de agua en lugar de muestra.

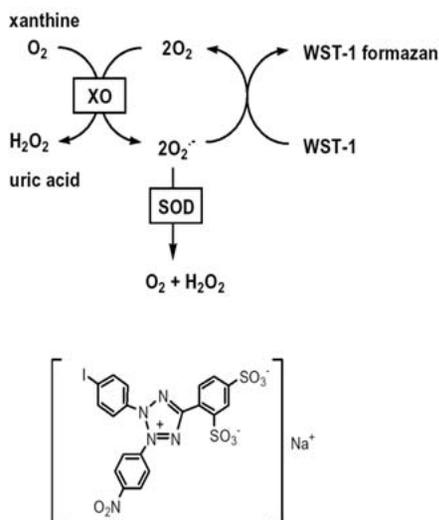


Figura 15. Fundamento del ensayo de actividad SOD.

En primer lugar se llenaron todos los pocillos con 20  $\mu\text{L}$  de la muestra correspondiente y 20  $\mu\text{L}$  de agua en los pocillos de los Blancos 1 y 3. Después, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de *WST* con una pipeta multicanal en todos los pocillos. En la mitad derecha de la placa se añadieron 20  $\mu\text{L}$  del tampón *Dilution* y en la mitad izquierda 20  $\mu\text{L}$  del reactivo EWS. Inmediatamente después se introdujo la placa en el lector y se inició el ensayo. Se realizaron lecturas continuadas cada minuto durante 10 minutos a 440 nm. Se construyeron rectas con los valores de absorbancia de cada muestra y del Blanco 1 y 3 respecto al tiempo. Los resultados de actividad SOD se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad SOD (\% inhibición muestra)} = \frac{[(S1 - S3) - Ss - S2]}{(S1 - S3)}$$

donde: S1=pendiente de la recta resultante de los valores de absorbancia del Blanco 1; S2=pendiente de la recta resultante de los valores de absorbancia del Blanco 2; S3=pendiente de la recta resultante de los valores de absorbancia del Blanco 3; Ss=pendiente de la recta resultante de los valores de absorbancia de la muestra s.

## Material y métodos

Los criterios establecidos para aceptar los resultados obtenidos o repetir la muestra fueron los mismos que en el resto de ensayos de actividad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20µL S1 200µL WST 20µL EWS	20µL S5 200µL WST 20µL EWS	20µL S9 200µL WST 20µL EWS	20µL S13 200µL WST 20µL EWS	20µL S17 200µL WST 20µL EWS	20µL S21 200µL WST 20µL EWS	20µL S1 200µL WST 20µL DF	20µL S5 200µL WST 20µL DF	20µL S9 200µL WST 20µL DF	20µL S13 200µL WST 20µL DF	20µL S17 200µL WST 20µL DF	20µL S21 200µL WST 20µL DF
B	20µL S1 200µL WST 20µL EWS	20µL S5 200µL WST 20µL EWS	20µL S9 200µL WST 20µL EWS	20µL S13 200µL WST 20µL EWS	20µL S17 200µL WST 20µL EWS	20µL S21 200µL WST 20µL EWS	20µL S1 200µL WST 20µL DF	20µL S5 200µL WST 20µL DF	20µL S9 200µL WST 20µL DF	20µL S13 200µL WST 20µL DF	20µL S17 200µL WST 20µL DF	20µL S21 200µL WST 20µL DF
C	20µL S2 200µL WST 20µL EWS	20µL S6 200µL WST 20µL EWS	20µL S10 200µL WST 20µL EWS	20µL S14 200µL WST 20µL EWS	20µL S18 200µL WST 20µL EWS	20µL S22 200µL WST 20µL EWS	20µL S2 200µL WST 20µL DF	20µL S6 200µL WST 20µL DF	20µL S10 200µL WST 20µL DF	20µL S14 200µL WST 20µL DF	20µL S18 200µL WST 20µL DF	20µL S22 200µL WST 20µL DF
D	20µL S2 200µL WST 20µL EWS	20µL S6 200µL WST 20µL EWS	20µL S10 200µL WST 20µL EWS	20µL S14 200µL WST 20µL EWS	20µL S18 200µL WST 20µL EWS	20µL S22 200µL WST 20µL EWS	20µL S2 200µL WST 20µL DF	20µL S6 200µL WST 20µL DF	20µL S10 200µL WST 20µL DF	20µL S14 200µL WST 20µL DF	20µL S18 200µL WST 20µL DF	20µL S22 200µL WST 20µL DF
E	20µL S3 200µL WST 20µL EWS	20µL S7 200µL WST 20µL EWS	20µL S11 200µL WST 20µL EWS	20µL S15 200µL WST 20µL EWS	20µL S19 200µL WST 20µL EWS	20µL S23 200µL WST 20µL EWS	20µL S3 200µL WST 20µL DF	20µL S7 200µL WST 20µL DF	20µL S11 200µL WST 20µL DF	20µL S15 200µL WST 20µL DF	20µL S19 200µL WST 20µL DF	20µL S23 200µL WST 20µL DF
F	20µL S3 200µL WST 20µL EWS	20µL S7 200µL WST 20µL EWS	20µL S11 200µL WST 20µL EWS	20µL S15 200µL WST 20µL EWS	20µL S19 200µL WST 20µL EWS	20µL S23 200µL WST 20µL EWS	20µL S3 200µL WST 20µL DF	20µL S7 200µL WST 20µL DF	20µL S11 200µL WST 20µL DF	20µL S15 200µL WST 20µL DF	20µL S19 200µL WST 20µL DF	20µL S23 200µL WST 20µL DF
G	20µL S4 200µL WST 20µL EWS	20µL S8 200µL WST 20µL EWS	20µL S12 200µL WST 20µL EWS	20µL S16 200µL WST 20µL EWS	20µL S20 200µL WST 20µL EWS	20µL H20 200µL WST 20µL EWS	20µL S4 200µL WST 20µL DF	20µL S8 200µL WST 20µL DF	20µL S12 200µL WST 20µL DF	20µL S16 200µL WST 20µL DF	20µL S20 200µL WST 20µL DF	20µL H20 200µL WST 20µL DF
H	20µL S4 200µL WST 20µL EWS	20µL S8 200µL WST 20µL EWS	20µL S12 200µL WST 20µL EWS	20µL S16 200µL WST 20µL EWS	20µL S20 200µL WST 20µL EWS	20µL H20 200µL WST 20µL EWS	20µL S4 200µL WST 20µL DF	20µL S8 200µL WST 20µL DF	20µL S12 200µL WST 20µL DF	20µL S16 200µL WST 20µL DF	20µL S20 200µL WST 20µL DF	20µL H20 200µL WST 20µL DF

S: Muestra; WST: WST Working Solution; EWS: Enzyme Working Solution; DF: tampón Dilution.

**Figura 16. Diseño estándar de una placa para el ensayo de actividad SOD.**

**Tabla 4. Esquema de los reactivos añadidos en cada pocillo en el ensayo de actividad SOD.**

	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Muestra	20 µL		20 µL	
H2O ultrapura		20 µL		20 µL
<i>WST working solution</i>	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
<i>Enzyme working solution</i>	20 µL	20 µL		
Tampón <i>Dilution</i>			20 µL	20 µL

### 3.7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Con el fin de determinar el grado de retención en el citoplasma de NRF2, como medida de su nivel de activación, las muestras se inmunoprecipitaron con Nrf2 y se inmunodetectaron con Keap1. Para ello se utilizaron los extractos proteicos totales de las muestras hepáticas correspondientes a todos los sacrificios y grupos experimentales.

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

De esta solución de proteínas inmunoprecipitadas se realizó un *Western Blot* para determinar los niveles de proteína unida en el citoplasma a Keap1. Para ello se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra en los geles y se realizaron las técnicas de

electroforesis y transferencia según lo descrito en el apartado 3.5. Del mismo modo, la membrana se incubó en tampón de bloqueo y posteriormente con la solución del anticuerpo primario Keap1 de cabra (SIGMA) a una concentración de 1:1250 en ese mismo tampón. Se realizaron 3 lavados y se incubó con la solución de anticuerpo secundario de anti-cabra (SIGMA) conjugado a peroxidasa de rábano en tampón de bloqueo a una concentración de 1:6000 durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, tras realizar varios lavados, las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia, mediante el mismo sistema que el descrito en el apartado 3.5.

### **3.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN**

Se utilizó el sistema comercial GSH/GSSG Ratio *Detection Assay kit* (Abcam). Su fundamento consiste en la unión de una molécula no fluorescente que se convierte en altamente fluorescente tras su reacción con el GSH. De esta manera es posible determinar la concentración de GSH y la de GSH total (GSSG reducido + GSH) de cada muestra cuantificando la fluorescencia específica (Excitación/Emisión= 490/250 nm).

Para la determinación de los niveles de GSH/GSSG se utilizaron muestras de plasma de todos los sacrificios y grupos experimentales. Las muestras fueron diluidas 1:10 en tampón *Assay*, proporcionado por el kit, y se cargaron 20  $\mu$ L de muestra en cada uno de los 4 pocillos correspondientes. Se prepararon dos rectas patrón a partir de dos soluciones madre de GSH y GSSG. Las concentraciones de las rectas fueron para el GSH de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563  $\mu$ M; y para el GSSG de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563 y 0.078  $\mu$ M. Se prepararon 220  $\mu$ L de cada disolución para cada ensayo y se mantuvieron en hielo hasta que se llenó la placa. Además, se prepararon soluciones de *GSH Assay Mixture* (GAM) y *Total GSH Assay Mixture* (TGAM).

La placa se dividió en dos mitades: una para la determinación de GSH, con su correspondiente recta patrón, y otra para la determinación de GSSG, también con su correspondiente recta patrón (Figura 17).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	m1	m1	m9	m9	B	B	m1	m1	m9	m9
B	0,1563 μM GSH	0,1563 μM GSH	m2	m2	m10	m10	0,078 μM GSSG	0,078 μM GSSG	m2	m2	m10	m10
C	0,3125 μM GSH	0,3125 μM GSH	m3	m3	m11	m11	0,1563 μM GSH	0,1563 μM GSH	m3	m3	m11	m11
D	0,625 μM GSH	0,625 μM GSH	m4	m4	m12	m12	0,3125 μM GSH	0,3125 μM GSH	m4	m4	m12	m12
E	1,25 μM GSH	1,25 μM GSH	m5	m5	m13	m13	0,625 μM GSH	0,625 μM GSH	m5	m5	m13	m13
F	2,5 μM GSH	2,5 μM GSH	m6	m6	m14	m14	1,25 μM GSH	1,25 μM GSH	m6	m6	m14	m14
G	5 μM GSH	5 μM GSH	m7	m7	m15	m15	2,5 μM GSH	2,5 μM GSH	m7	m7	m15	m15
H	10 μM GSH	10 μM GSH	m8	m8	m16	m16	5 μM GSH	5 μM GSH	m8	m8	m16	m16

Figura 17. Diseño estándar de una placa para la determinación GSH/GSSG. B: blanco; m: muestra.

Se añadieron 50 μL de las muestras y de las soluciones estándar en los respectivos pocillos. En la mitad izquierda de la placa se añadieron 50 μL de la solución GAM y en la mitad derecha se añadieron 50 μL en la solución TGAM. Más tarde se introdujo la placa en el lector y tras una incubación de 30 minutos se midió la fluorescencia a  $Ex/Em = 490/250$  nm.

Para el tratamiento de los resultados se representaron gráficamente las concentraciones de las rectas estándar respecto a la fluorescencia obtenida. Los valores de fluorescencia de las muestras se interpolaron en las rectas patrón calculando así, para cada muestra un valor (μM) de GSH y de GSH total (recta patrón de GSSG). Con los valores de GSH y GSH total para cada muestra se calcularon los siguientes parámetros:

- $GSSG = (GSH \text{ total} - GSH)/2 \rightarrow GSH \text{ total} = GSH + 2 \text{ GSSG}$
- $GSH/GSH \text{ total}$
- $GSH/GSSG$
- $GSH \text{ total} = GSH + GSSG$

### **3.9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE).**

La técnica de detección mediante Cromatografía líquida (CLAE/VIS) fue realizada en colaboración con el departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

La cromatografía líquida de alta eficacia se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, separadas unas de otras. En concreto, la técnica utilizada para la determinación de malondialdehído (MDA) fue la cromatografía de reparto/adsorción en fase reversa. Ésta se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, siendo ésta última de naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) produciéndose así interacciones inespecíficas (efecto solvóforo).

Para la determinación de los niveles de MDA se utilizó el método descrito por Wong y colaboradores (Wong et al., 1987), en el cual una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un cromógeno rosado con un pico máximo de absorción entre longitudes de onda de 532-535 nm. Los resultados obtenidos se expresaron por mL de plasma.

Los reactivos utilizados en este método se elaboraron de la siguiente manera:

- Tampón acetato sódico anhidro (AcONa) 2M pH 3,5, con TBA 0,2%. Para preparar 1L de tampón se tomaron 118 ml de ácido acético glacial (PM = 60,05;  $\delta = 1,05\text{g/ml}$ ;  $r=99,7\%$ ) y se añadieron 600 ml de agua. Se ajustó el pH hasta 3,5 con NaOH 10M. Una vez ajustado el pH, se añadieron 2 g de TBA y se mantuvo en agitación a 50-60°C hasta la disolución del TBA. Se comprobó que se mantenía el pH y si no fue así, se volvió a ajustar. Finalmente se aforó el volumen a 1L y se guardó protegido de la luz a 4 °C.

- Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 6,8. Para preparar 500 ml se pesaron 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se añadieron unos 400 ml de agua, el pH se ajustó con KOH 1M hasta 6,8 y se aforó con agua hasta el volumen final. Se guardó a 4°C.
- Tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 3,5. Para preparar 500 ml se pesaron 3,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se añadieron unos 400 ml de agua; el pH se ajustó con HCl 1M hasta 3,5 y se aforó con agua hasta el volumen final. Se guardó a 4°C.

Al tratarse de un método isocrático (el solvente conserva la misma concentración durante todo el tiempo de corrida) se necesitaron dos fases diferentes: la “fase de lavado” y la “fase de elución”. La fase de elución (fase B) está constituida por una mezcla de acetonitrilo/agua (70/30), ambos de máxima pureza. En relación a la fase de lavado (fase A), la sal que contiene esta fase es  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 6,8/acetonitrilo (83/17). Se pesaron 13.6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y disolvieron en unos 1800 ml de agua. Se ajustó el pH de esta disolución hasta 6,8 con KOH 1M o, en su lugar, disoluciones de KOH de distinta concentración, y se enrasó el volumen hasta 2 L con agua. A estos 2 L de disolución se añadieron 410 mL de acetonitrilo y se agitó hasta su completa homogenización. Finalmente la solución se filtró (con bomba de vacío y filtro 0.22  $\mu\text{m}$  de Millipore) y desgasificó con un baño de ultrasonidos durante 20 minutos.

La identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se llevó a cabo mediante una curva patrón, por lo cual previamente al ensayo hubo que preparar diferentes concentraciones de MDA. Se partió de una solución comercial de MDA-bis (Merk Millipore) de una concentración 12.2 M y se obtuvo una dilución 10 mM (410  $\mu\text{L}$  de MDA 12.2 M y 500 mL de agua desionizada). Se diluyó la solución anterior a la mitad, con lo que se obtuvo una nueva solución 5 mM y a partir de aquí se obtuvieron las necesarias para los puntos de la recta patrón: 50  $\mu\text{M}$  (dilución 1/100 5 mM de MDA); 25  $\mu\text{M}$  (dilución  $\frac{1}{2}$  50  $\mu\text{M}$ ); 12,5  $\mu\text{M}$  (dilución  $\frac{1}{2}$  25  $\mu\text{M}$ ); 5  $\mu\text{M}$  (dilución 1/5 25  $\mu\text{M}$ ); 2,5  $\mu\text{M}$  (dilución  $\frac{1}{2}$  5  $\mu\text{M}$ ); 1,25  $\mu\text{M}$  (dilución  $\frac{1}{2}$  2,5  $\mu\text{M}$ ); y Blanco (25  $\mu\text{l}$  de agua + 500  $\mu\text{l}$  de tampón AcOH 2M pH 3,5 + TBA 0,2%).

Las muestras de plasma obtenidas durante los sacrificios de los animales fueron conservadas a -80°C y protegidas de la luz desde su extracción hasta su utilización. Se utilizaron muestras de todos los grupos y sacrificios con una n=5. Antes de ser

## Material y métodos

introducidas en el aparato de CLAE las muestras fueron preparadas como se describe a continuación.

Para cada muestra se prepararon *ependorfs* con 500  $\mu\text{L}$  de tampón AcOH 2M pH 3,5, TBA 0,2% a los cuales se les añadió 20  $\mu\text{L}$  de muestra o patrón. Tras una agitación, las muestras se incubaron durante 60 minutos a una temperatura de  $+95^{\circ}\text{C}$ . En este tiempo se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de MDA, que se conjugan con dos moléculas de TBA. Por tanto, estrictamente, se determina el aducto MDA-TBA<sub>2</sub> como índice de peroxidación lipídica. Después de la incubación, las muestras se mantuvieron en hielo y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 6,8 a cada muestra o patrón. Tras una agitación las muestras se centrifugaron 5 minutos a 13.000g y a  $+4^{\circ}\text{C}$  y justo después se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 3,5 y se agitó. Por último se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una placa transparente de poliestireno de absorción en el visible para realizar el análisis por CLAE.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Flujo de 1,2 mL/min; detección mediante detector uv-vis a 532 nm; columna C-18 *Spherisorb* de 15 cm de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula.

El método cromatográfico que se utilizó fue el isocrático, por ello solo se necesitó programar el tiempo que estarían pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Cada cromatograma fue de 30 min de duración y la secuencia de las fases móviles a través del CLAE fueron las que se muestran en la Figura 18.



**Figura 18. Programación de la duración (minutos) de las fases A y B durante un cromatograma del análisis de MDA.**

La programación de muestras supone repetir cada secuenciación anterior tantas veces como muestras y patrones se deseen analizar, de tal manera que para cada muestra se obtiene un cromatograma (Figura 19).

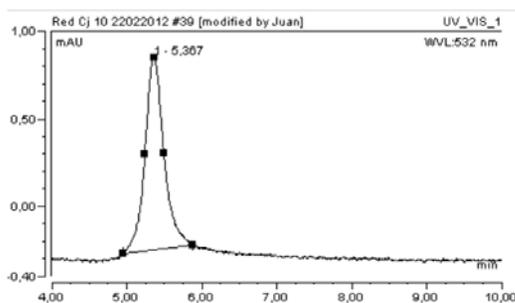


Figura 19. Cromatograma de una muestra problema.

### 3.10. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNAS OXIDADAS EN PLASMA

Para la determinación del daño oxidativo en proteínas se utilizó el kit *Protein Oxidation Detection Kit S7150 (Oxyblot)*. El fundamento del método consiste en que los radicales libres son capaces de oxidar los aminoácidos que conforman las proteínas originando grupos carbonilo que pueden detectarse mediante *Western Blot*. El kit permite cuantificar estos grupos carbonilo, proporcionando así un indicador del grado de oxidación de las proteínas.

Las muestras de plasma se diluyeron 1:10 para su cuantificación por el método *Protein ASSAY Kit (Sigma-Aldrich Química)*. Para la preparación del reactivo *Lowry* se añadieron 40 mL de agua en la botella de reactivo *Lowry Reagent Powder* y se agitó a temperatura ambiente hasta su completa disolución. Para la preparación del reactivo de *Folin-Ciocalteu* se añadieron 88 mL de agua y 18 mL de la solución *Folin Ciocalteu's Phenol Reagent* en una botella opaca. Este método constó de dos etapas. En una primera etapa se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de muestra, 490  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y 500  $\mu\text{L}$  del reactivo *Lowry*. Las muestras se incubaron a oscuridad durante 20 minutos. Durante este tiempo los iones  $\text{Cu}^{2+}$  se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos, lo que provoca el desdoblamiento de su estructura tridimensional y los residuos de tirosina quedan expuestos. En una segunda etapa se añadieron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo *Folin* y se incubaron las muestras durante 30 minutos en oscuridad. Durante este tiempo se produjo la reducción de este reactivo por los grupos fenólicos de tirosina actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de *Folin-Ciocalteu*

## Material y métodos

es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. Finalmente se midió la absorbancia a 660 nm utilizando cubetas de poliestireno. La concentración de proteínas se calculó interpolando los valores de absorbancia de cada muestra en una recta patrón. Para ello se prepararon diferentes concentraciones de BSA y se representaron sus valores de absorbancia respecto a sus concentraciones. Se escogió la parte lineal de la curva y se calculó la recta de regresión que mejor se ajustaba.

Después de cuantificar las proteínas se procedió a la derivatización de las muestras. El procedimiento de derivatización tuvo como objetivo el marcaje de los grupos carbonilo de las proteínas con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) transformando así estos grupos en 2,4-dinitrofenilhidrazona, los cuales son detectados por los anticuerpos proporcionados por el kit. Se añadieron 5  $\mu$ L de muestra en cada *ependorf* conteniendo 15  $\mu$ g de proteína, 5  $\mu$ L de SDS al 12 % p/v y 10  $\mu$ L de DNPH. Para el control negativo se añadió la solución de derivatización control. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadieron 7,5  $\mu$ L del reactivo de neutralización y 1,5  $\mu$ L de  $\beta$ ME.

La determinación de los niveles de proteínas oxidadas se realizó mediante *Western Blot*. En este caso, las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de 12,5% de acrilamida (29:1 acrilamida: bisacrilamida) con 0.1% de SDS como agente desnaturalizante. Se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 mV durante 90 minutos en tampón Tris-Glicina-SDS (véase apartado C.4). Posteriormente las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF (Schelider & Shuel, USA) a amperaje constante de 170 mA durante una hora a +4°C en tampón de transferencia Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3). A continuación la membrana fue bloqueada en tampón 10% p/v de BSA, 0.1 Tween-20 en 1xPBS (PBS-T) durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo primario específico de los grupos carbonilo derivatizados proporcionado por el kit a una concentración de 1:150 en tampón de bloqueo durante toda la noche en agitación a +4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 15 mL de PBS-T 0.1%. La membrana fue incubada durante 3 horas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de

rábano contra el anticuerpo primario a una dilución 1:300 en tampón de bloqueo. Finalmente se realizaron 3 lavados como en el paso anterior y la membrana se incubó con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Pharmacia, USA) durante 2 minutos y las imágenes fueron captadas mediante el programa *Image Gauge* V4.0 de *Fujifilm*. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital TIF para poder realizar la densitometría de las bandas, utilizando el programa *Image J*. Como control de carga, se tiñeron las membranas con rojo *Ponceau* en solución acuosa. Así, se calculó la densitometría haciendo la ratio: densitometría de la carbonilación de proteínas/ densitometría de la membrana teñida con rojo *Ponceau*. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de proteínas oxidadas.

### 3.11. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE 8-OHdG EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA

Para la determinación del daño oxidativo en el DNA se utilizó el kit comercial *Oxidative DNA Damage Elisa Kit 8-OHdG Quantitation* (OxiSelect™). El método se basa en un ELISA competitivo. Todos los reactivos fueron proporcionados por el kit excepto las enzimas nucleasa y fosfatasa alcalina. Primeramente, la placa fue incubada durante 16 horas con el reactivo *8-OHdG conjugate* a +4°C.

Se prepararon las muestras de ADN en un rango de 50-200ng/μL y fueron incubadas a 95°C durante 5 min para su desnaturalización. Inmediatamente después, fueron tratadas con 0.02 U de enzima nucleasa P1 (SIGMA) en 20 mM de acetato de sodio pH 5,2 e incubadas durante 2 horas a 37 °C para su digestión en nucleótidos simples. Transcurrida la incubación, las muestras se trataron con 0.125 U de fosfatasa alcalina (SIGMA) en TRIS para la conversión de los nucleótidos en nucleósidos. Se prepararon soluciones de 20; 10; 5; 2.5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156 y 0,078 ng/mL de 8-OHdG a partir del reactivo 8-OHdG Standard 2 μg/mL.

La placa fue bloqueada con el reactivo *Assay Diluent* durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación orbital. Tras retirar el agente bloqueante se añadieron las muestras, el blanco y los estándares en la placa por duplicado. Transcurridos 10 minutos se añadió en todos los pocillos 50 μL del anticuerpo

## Material y métodos

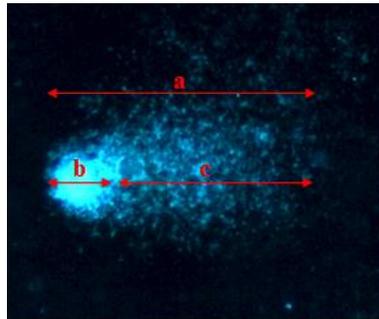
primario *Anti-8-OHdG Antibody* y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación orbital. Seguidamente, se retiró el anticuerpo primario y se lavó la placa con el reactivo *Wash Buffer* y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo secundario *Secondary Antibody, HPR Conjugate* en todos los pocillos. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora en agitación orbital. Más tarde, se lavaron los pocillos y se añadió el reactivo *Substrate Solution* en todos los pocillos. Transcurridos dos minutos (momento que coincidió con la aparición de color azul) se añadió el reactivo *Stop Solution* e inmediatamente después se procedió a la lectura de la placa en el espectrofotómetro a 450 nm. Al tratarse de un ensayo competitivo, las muestras con menor color fueron las que tuvieron una mayor cantidad de 8-OHdG. Al añadir la muestra con el anticuerpo primario se produjo la unión de éste al antígeno de la muestra (8-OHdG) y el excedente se unió a los antígenos de la placa. Sólo esta segunda unión provocó color. Es por ello que a mayor color, más anticuerpo libre pudo unirse a los antígenos de la placa, y por tanto menor fue la cantidad de 8-OHdG presente en la muestra.

Se representó una recta estándar con los valores de absorbancia de las soluciones estándar frente a sus respectivas concentraciones de 8-OHdG. En esta recta se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras calculando así sus concentraciones de 8-OHdG. Finalmente, se relativizó cada valor de concentración a su correspondiente cantidad de DNA en el pocillo. Así, los resultados de las muestras se expresaron en ng de 8-OHdG/mL / $\mu\text{g}$  DNA.

### **3.12. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE DAÑO EN EL ADN MEDIANTE EL ENSAYO COMET EN GLÁNDULA MAMARIA**

El ensayo Comet, también conocido como “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (SCGE) se basa en una electroforesis de células individuales en geles de agarosa. La técnica consiste en someter una suspensión celular a una lisis alcalina, a un tratamiento para desenrollar el ADN y, finalmente, a una migración electroforética de corta duración. El material genético no dañado migrará agrupado en forma esférica, mientras que los fragmentos de menor medida, producidos por roturas en el ADN,

migrarán a una distancia superior dando lugar a una imagen parecida a la cola de un cometa (Figura 20).



**Figura 20. Imagen representativa del ensayo comet.** a: ADN genómico de una célula; b: ADN no dañado o cabeza; c: fragmentos de ADN o cola.

En primer lugar, se preparó una primera capa de agarosa al 1% sobre un portaobjetos. Para ello se hirvieron los portas en 10 volúmenes de agua oxigenada y agua desionizada en una proporción 2:1 durante 1 hora. Tras dejar secar los portas al aire, estos fueron incubados en etanol 70% durante un mínimo de 1 hora. Una vez desengrasados, los portaobjetos se sumergieron en agarosa caliente al 1% durante unos segundos con el fin de crear una fina capa de agarosa en su superficie. A continuación se obtuvo la suspensión celular a partir de muestras de glándula mamaria. Tras disgregar el tejido glandular mamario se realizó una incubación con tripsina al 0.5% a +37°C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 3 mL de PBS al 1% y suero (9:1) y se incubó en hielo para ayudar a precipitar los restos de tejido. Se recuperó el sobrenadante y posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante resultante se le añadieron 500  $\mu$ L de PBS al 1% y suero (9:1). Se tomaron 35  $\mu$ L de la suspensión celular obtenida y se mezclaron con 80  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Una vez realizada la mezcla, se aplicaron unas gotas sobre el portaobjetos recubierto de una primera capa de agarosa y se cubrió con un cubreobjetos dejándolo reposar en horizontal a -20°C durante 6 minutos. Pasado este tiempo se quitaron los cubreobjetos.

El siguiente paso consistió en la lisis celular realizada en una solución de lisis a pH  $\geq 13$  alcalina que contenía NaCl 2.5 M, Na-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 6 g de NaOH y *Lauryl Sarcosine* al 1. Los portas fueron sumergidos en la solución de lisis

durante 2 horas a +4°C. Transcurrido el tiempo, los portas se colocaron en la cubeta de electroforesis y se cubrieron con tampón de electroforesis (Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH ≥13). El tiempo de incubación necesario para conseguir desenrollar el ADN fue de 40 minutos. A continuación se realizó la electroforesis alcalina a 25 V y 300 mA durante 40 minutos. Al finalizar se realizaron 3 lavados en tampón Tris-HCl pH 7.5, previamente enfriado, de 5 minutos cada uno. Los portas se dejaron secar al aire hasta el momento del análisis.

Antes de analizar las muestras al microscopio, los portas secados se hidrataron en agua ultrapura durante 10 minutos y a continuación se tiñeron con 4,6 *Diamino-2-Phenylindole Dihydrachloride Hydrate* (DAPI) a una concentración de 5 µg/ml durante 3 minutos. La captación y análisis de imagen se realizó con el programa *analySIS®*. Las muestras se ensayaron por duplicado y se analizaron más de 90 células por muestra. La cuantificación del daño en el ADN consistió en el cálculo del porcentaje de la señal obtenida de la cola respecto al total (Figura 20).

## **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La normalidad de los datos se comprobó con el test *Kolmogorov-Smirnov* y la homogeneidad de varianzas con el test de *Levene* observándose así que los datos no seguían una distribución normal y las varianzas eran heterogéneas. Por tanto, se aplicó una estadística no paramétrica en todo el estudio para dar homogeneidad a los análisis estadísticos. Se utilizó el software *SPSS Statistics 20*. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

### **4.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS**

#### **4.1.1. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL**

- **Datos cuantitativos.**

Para el análisis de la evolución ponderal se utilizó el test estadístico de Modelos No lineales Mixtos (Pinheiro, 2000) para ajustar los datos de cada grupo a una función de regresión asintótica. Se realizó una estimación del peso corporal diario

de los animales mediante una regresión lineal para predecir los valores que faltaban. Los datos del peso e índices de masa corporal de los animales en momentos determinados del ensayo (sacrificios) se analizaron mediante la prueba no paramétrica de la *U de Mann-Whitney*.

#### 4.1.2. CARCINOGENESIS

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

- **Datos cualitativos.**

- Estudio temporal: Comparación entre curvas mediante el análisis de la varianza no paramétrico de 2 factores -test de *Friedman*-.
- Sacrificio: Prueba de la ji-cuadrado ( $\chi^2$ ). Los tratamientos con dos caracteres fueron de dos tipos: comparación de frecuencias observadas, y comparación de reparticiones observadas frente a reparticiones teóricas dadas por la hipótesis nula de equiprobabilidad. En el caso de más de dos caracteres, la estrategia del tratamiento se basó en el análisis de relación de todos ellos (Domenech, 1977). Se aplicaron sistemáticamente los criterios de *Lewontin RC* y *Felsenstein J* para las frecuencias calculadas de todas las tablas 2xN.

- **Datos cuantitativos.**

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

## Material y métodos

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

### 4.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

- **Datos cualitativos**

Se utilizó la prueba de ( $\chi^2$ ) para analizar los datos obtenidos del estudio de la densidad de la glándula mamaria.

- **Datos cuantitativos**

Los resultados fueron analizados mediante el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney*.

### 4.3. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

- **Datos cuantitativos**

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

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

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

MATERIALES Y MÉTODOS

**RESULTADOS**

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



Los resultados de este trabajo se han agrupado en tres apartados: I) Efectos de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal y el estrés oxidativo en animales sanos; II) Efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en la iniciación de la iniciación de la carcinogénesis mamaria; III) Efectos de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal, la carcinogénesis mamaria y el estrés oxidativo en animales inducidos con el carcinógeno.

## 1. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES SANOS

Con el objetivo de estudiar la influencia de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en animales sanos, se determinaron diferentes parámetros de estrés en los tres grupos en diferentes edades. Así, se estudió la defensa antioxidante enzimática, mediante la determinación de la expresión y la actividad de diferentes genes antioxidantes; la defensa antioxidante no enzimática, mediante los parámetros del glutatión; y la peroxidación lipídica, mediante la determinación de los niveles de MDA.

Con el fin de asegurar que las diferencias observadas entre los grupos experimentales fueran atribuidas exclusivamente al tipo de dieta, se consideró necesario descartar posibles patologías debidas a desequilibrios nutricionales así como comprobar el correcto crecimiento de en los animales. Este estudio se basó, por una parte, en la exploración sistemática de los animales a lo largo del ensayo y, por otra, en el análisis de la evolución ponderal y la masa corporal, ya que ambos parámetros se consideran un buen reflejo del desarrollo de los animales.

### 1.1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL

El estudio del crecimiento de los animales incluyó el análisis ponderal, a partir de la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo. Los datos se obtuvieron a partir de las 20 determinaciones semanales que se realizaron. Previamente se comprobó la linealización de los datos mediante el análisis de residuos utilizando los datos del tiempo en logaritmos. Los datos se ajustaron a una regresión polinómica de grado 2, obteniéndose en todos los casos valores de  $R^2$  superiores a 0,8. La función obtenida fue la siguiente:

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

El ajuste a una regresión polinómica permitió una mejor interpretación de los resultados ya que fue posible explicar las diferencias entre dietas a partir de los parámetros del modelo: una diferencia en ordenadas indicará que en origen los grupos ya eran distintos, mientras que una diferencia en pendientes (coeficiente de  $\log(\text{tiempo}/\beta_2)$ ) indicará una distinta evolución a lo largo del tiempo.

En la Figura 21 se muestra la evolución ponderal media y la de los coeficientes de variación del peso corporal de los diferentes grupos de la serie experimental. Tal como se puede observar, los pesos fueron homogéneos a lo largo del estudio y los coeficientes de variación uniformemente bajos y de evolución constante en todos los grupos.

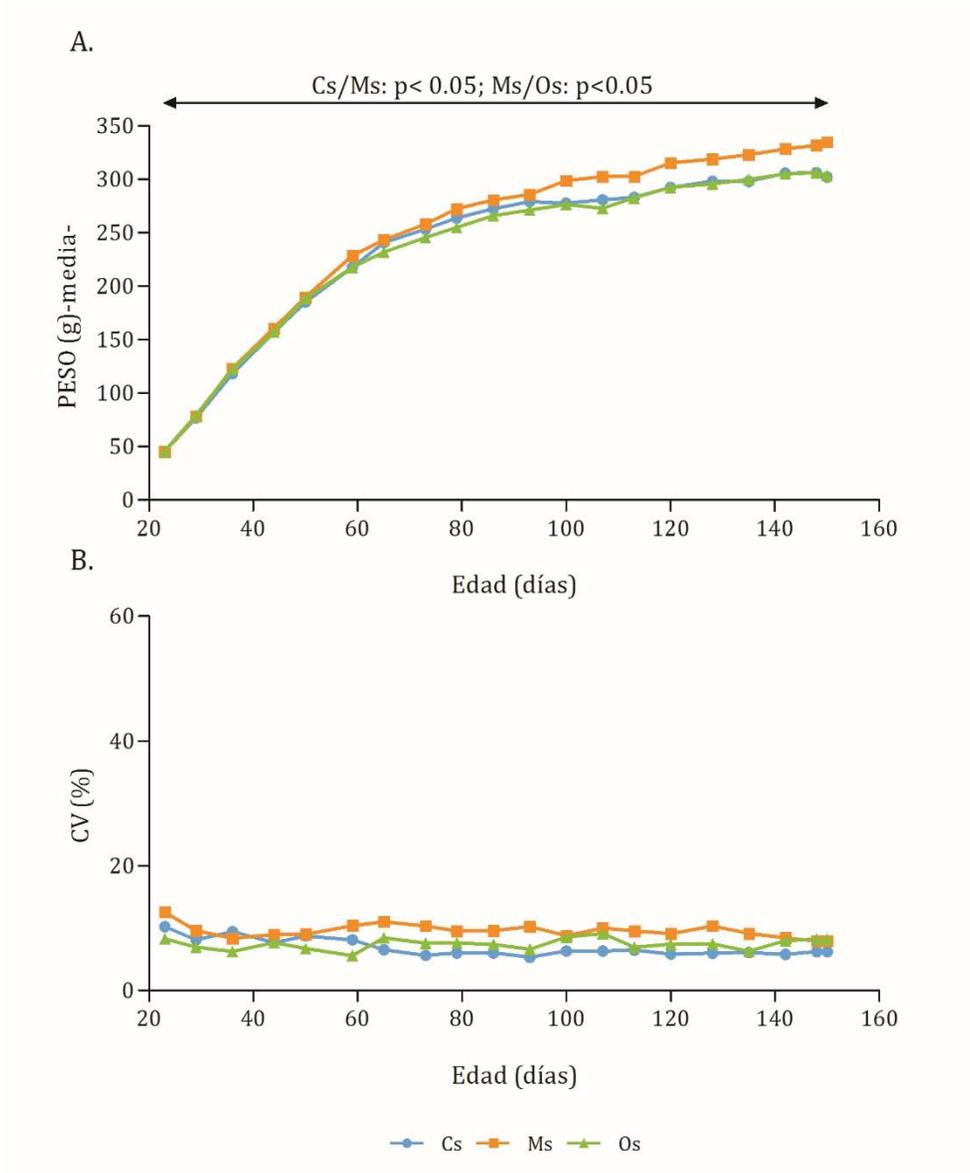
El grupo de animales sanos alimentados con la dieta de aceite de maíz mostró valores de peso corporal significativamente superiores que los animales de los grupos control y de aceite de oliva, que mostraron pesos similares (Figura 21 A).

Por otra parte, utilizando los datos del peso corporal y de la longitud naso-anal obtenidos en las determinaciones semanales, se analizó la masa corporal a través del Índice de Lee, específico de rata (Figura 22 A, B), y el Índice de Masa Corporal o Índice de Quetelet (Figura 23 A, B). Para el Índice de Lee se realizó el análisis estadístico no paramétrico de Friedman, mientras que en el caso del Índice de Masa Corporal se realizó un ajuste de regresión polinómica:

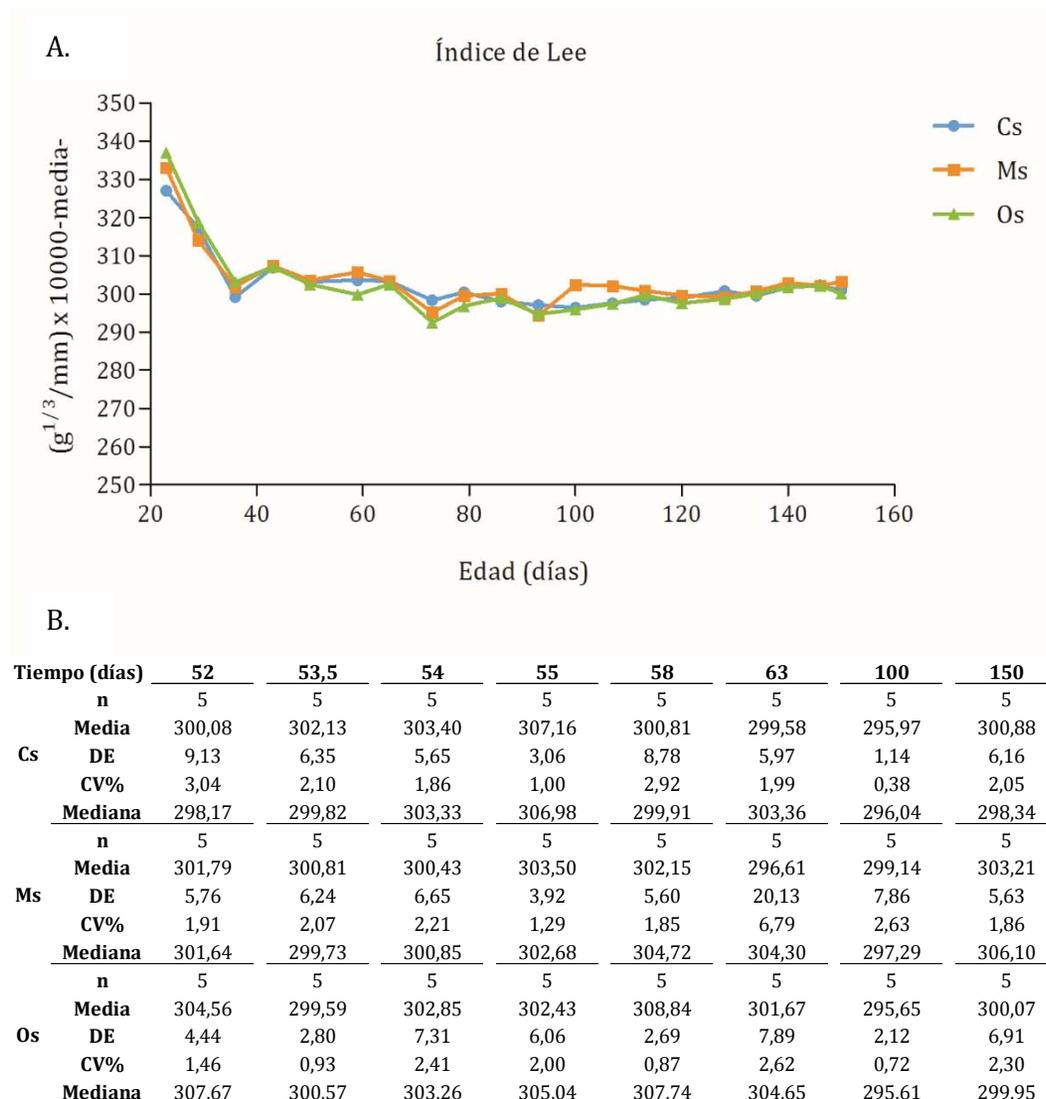
$$IMC = a + \beta_1 \times \log(\text{tiempo}) + \beta_2 \times \log(\text{tiempo})^2$$

En ambos casos, las diferencias estadísticas entre los grupos fueron escasas. En el caso del Índice de Masa Corporal, el grupo de aceite de maíz presentó valores significativamente superiores a los del grupo de aceite de oliva (Figura 23 A), y éstos fueron similares a los del grupo control.

Resultados

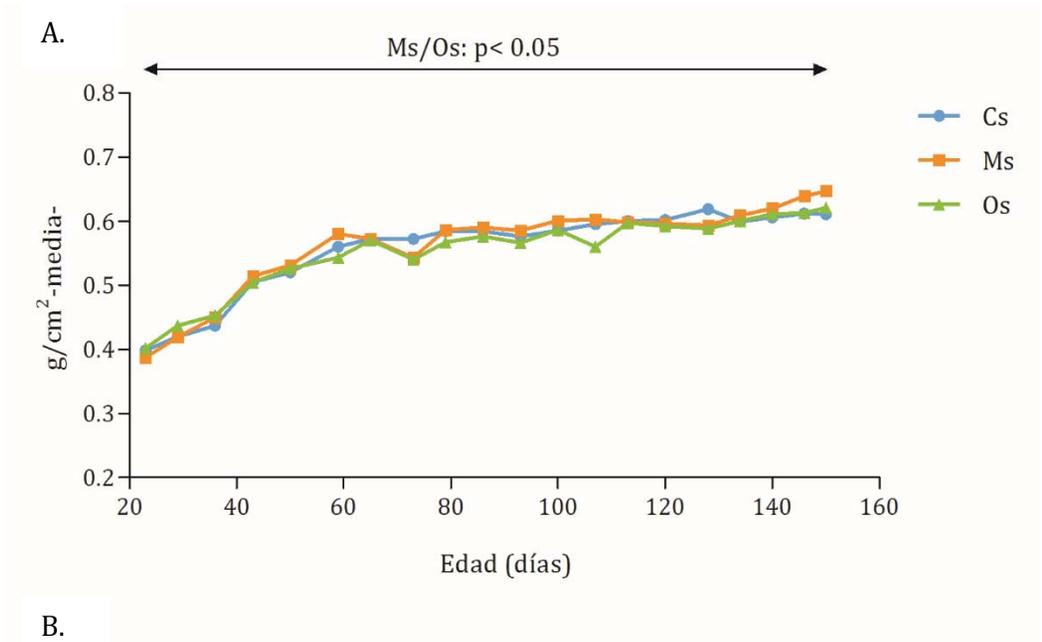


**Figura 21. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales sanos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo. A. Evolución del peso corporal (media). B. Coeficiente de variación del peso corporal. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.**



**Figura 22. Evolución del Índice de Lee de los animales sanos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.** A. Evolución del Índice de Lee  $[(\text{peso corporal} - \text{g})^{1/3} / \text{longitud naso-anal} - \text{mm}] \times 10000$  (media). B. Índice de Lee en cada una de las edades estudiadas. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano. n: número de efectivos; DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación %.

Resultados



B.

Tiempo (días)	52	53,5	54	55	58	63	100	150
<b>Cs</b>								
n	5	5	5	5	5	5	5	5
Media	0,51	0,53	0,53	0,56	0,54	0,54	0,58	0,61
DE	0,04	0,04	0,03	0,02	0,04	0,03	0,01	0,03
CV%	8,34	7,43	5,71	2,70	7,72	6,18	2,14	5,47
Mediana	0,49	0,52	0,53	0,56	0,55	0,55	0,57	0,61
<b>Ms</b>								
n	5	5	5	5	5	5	5	5
Media	0,52	0,53	0,52	0,55	0,54	0,54	0,59	0,64
DE	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,10	0,05	0,03
CV%	5,86	5,83	6,74	3,71	6,37	18,95	9,08	5,27
Mediana	0,52	0,52	0,52	0,55	0,55	0,58	0,59	0,65
<b>Os</b>								
n	5	5	5	5	5	5	5	5
Media	0,54	0,52	0,54	0,54	0,59	0,56	0,57	0,61
DE	0,02	0,02	0,04	0,02	0,03	0,04	0,02	0,04
CV%	3,73	3,28	7,57	4,27	5,43	6,83	3,15	7,06
Mediana	0,55	0,52	0,53	0,54	0,60	0,57	0,56	0,62

Figura 23. Evolución del Índice de Masa Corporal de los animales sanos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo. A. Evolución del Índice de Masa Corporal (peso corporal -g / longitud naso-anal<sup>2</sup> -cm<sup>2</sup>-) (media). B: Índice de Masa Corporal en cada una de las edades estudiadas. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano. n: número de efectivos; DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación %.

## **1.2. ESTRÉS OXIDATIVO**

### **1.2.1. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA**

El estudio de la defensa antioxidante enzimática consistió en el análisis de los niveles de expresión de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR) en hígado y en glándula mamaria mediante la determinación de los niveles relativos de ARNm. Asimismo, se determinaron los niveles de actividad hepática de las enzimas SOD total, CAT y GPX total. Además, para profundizar en el estudio de la regulación de la expresión hepática de dichas enzimas se determinaron los niveles proteicos totales del factor de transcripción NRF2 así como los niveles de su retención citoplasmática, como medida indirecta de su grado de activación.

#### **1.2.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN HÍGADO Y GLÁNDULA MAMARIA**

El perfil de expresión de las enzimas antioxidantes de caracterizó tanto en hígado como en glándula mamaria en cada uno de los grupos experimentales. Para ello se escogieron 4 edades representativas de la vida de la rata: 24, 52, 100 y 150 días de edad, correspondientes a la etapa prepuberal, postpuberal inmediata, adulta joven y adulta avanzada, respectivamente. El estudio contempló tres aproximaciones distintas.

Primeramente se comparó la expresión de las diferentes enzimas a lo largo del tiempo en cada uno de los grupos experimentales. En hígado, la enzima CAT fue la de mayor expresión, seguida de GPX1, SOD1, GPX4, SOD2 y GR (Tabla 5, Figura 24). Las diferencias estadísticas fueron significativas en todos los casos excepto entre SOD1 y GPX4, y entre SOD2 y GR (Tabla 6). En glándula mamaria la enzima mayoritaria también fue CAT, seguida de GPX1, GPX4, SOD1 y SOD2, todas ellas con niveles de expresión similares, y finalmente GR (Tabla 5, Figura 25). Las diferencias fueron significativas en todos los casos excepto entre SOD1 y SOD2, SOD1 y GR, y GPX1 y GPX4 (Tabla 6). Se comprobó que la dieta no provocó cambios en este perfil de expresión de las enzimas antioxidantes en ninguno de los dos tejidos.

Al comparar los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes entre ambos tejidos se observó que la expresión de CAT, SOD1 y GPX1 en hígado fue significativamente superior a la expresión en glándula mamaria en todos los grupos

## *Resultados*

experimentales. Los animales alimentados con dietas hiperlipídicas presentaron, además, unos niveles de GR superiores en hígado que en tejido mamario. Por otra parte, en animales alimentados con dieta de aceite de oliva los niveles de expresión de SOD2 hepáticos fueron inferiores a los obtenidos en glándula mamaria (Tablas 5 y 7, Figuras 24 y 25).

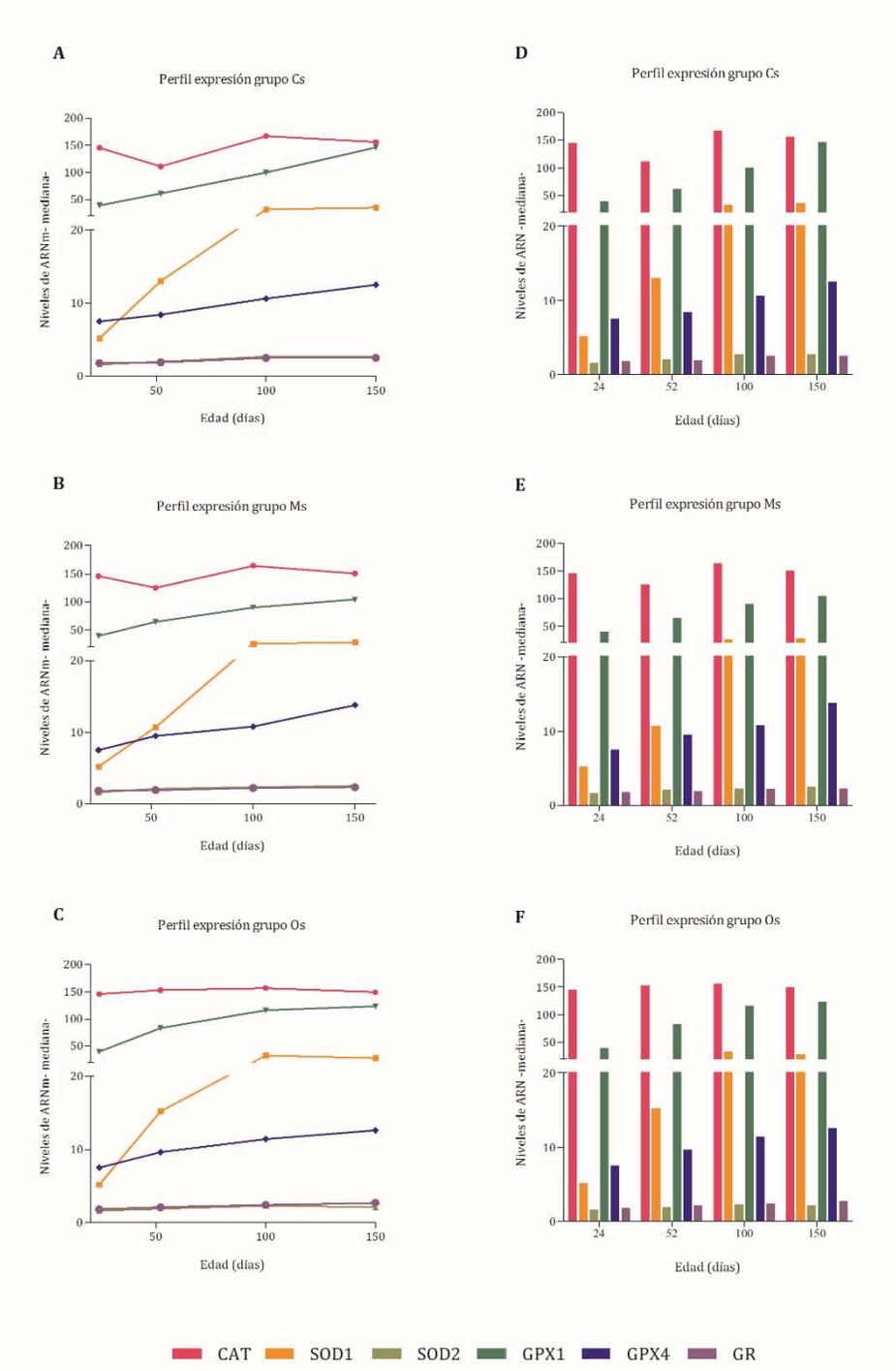
En segundo lugar, se analizaron las diferencias de expresión entre las distintas enzimas antioxidantes en cada una de las edades estudiadas. Así, en tejido hepático, justo después del destete, a los 24 días de edad, la enzima de mayor expresión fue CAT, seguida de GPX1, y de GPX4, SOD1, SOD2 y GR. En la edad postpuberal inmediata, el perfil de expresión fue similar pero la expresión de SOD1 fue superior a la de GPX4. Este perfil se mantuvo en la edad adulta, tanto a 100 como a 150 días. No se observaron cambios a ninguna edad por efecto del tipo de dieta administrada (Tabla 5, Figura 24). Todas las diferencias observadas entre enzimas en cada una de las edades fueron estadísticamente significativas, excepto entre SOD2 y GR cuyos niveles de expresión fueron prácticamente idénticos entre sí, a todas las edades y en todos los grupos experimentales (Tabla 8). En glándula mamaria, a 24 días de edad, CAT también fue la enzima antioxidante de mayor expresión, seguida de GPX4 y GPX1, y de SOD2, GR y SOD1. En el resto de edades, las tres enzimas mayoritarias continuaron siendo CAT, GPX1 y GPX4, seguidas de SOD2 o SOD1 y GR. Este perfil de expresión se mantuvo con escasas diferencias en los diferentes grupos experimentales (Tabla 5, Figura 25). En general, todas las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas, excepto entre SOD1 y SOD2 que mostraron niveles de expresión similares entre sí en todas las edades independientemente del tipo de dieta (Tabla 8).

Tabla 5. Expresión de las enzimas antioxidantes en hígado y glándula mamaria de animales sanos de los diferentes grupos experimentales.

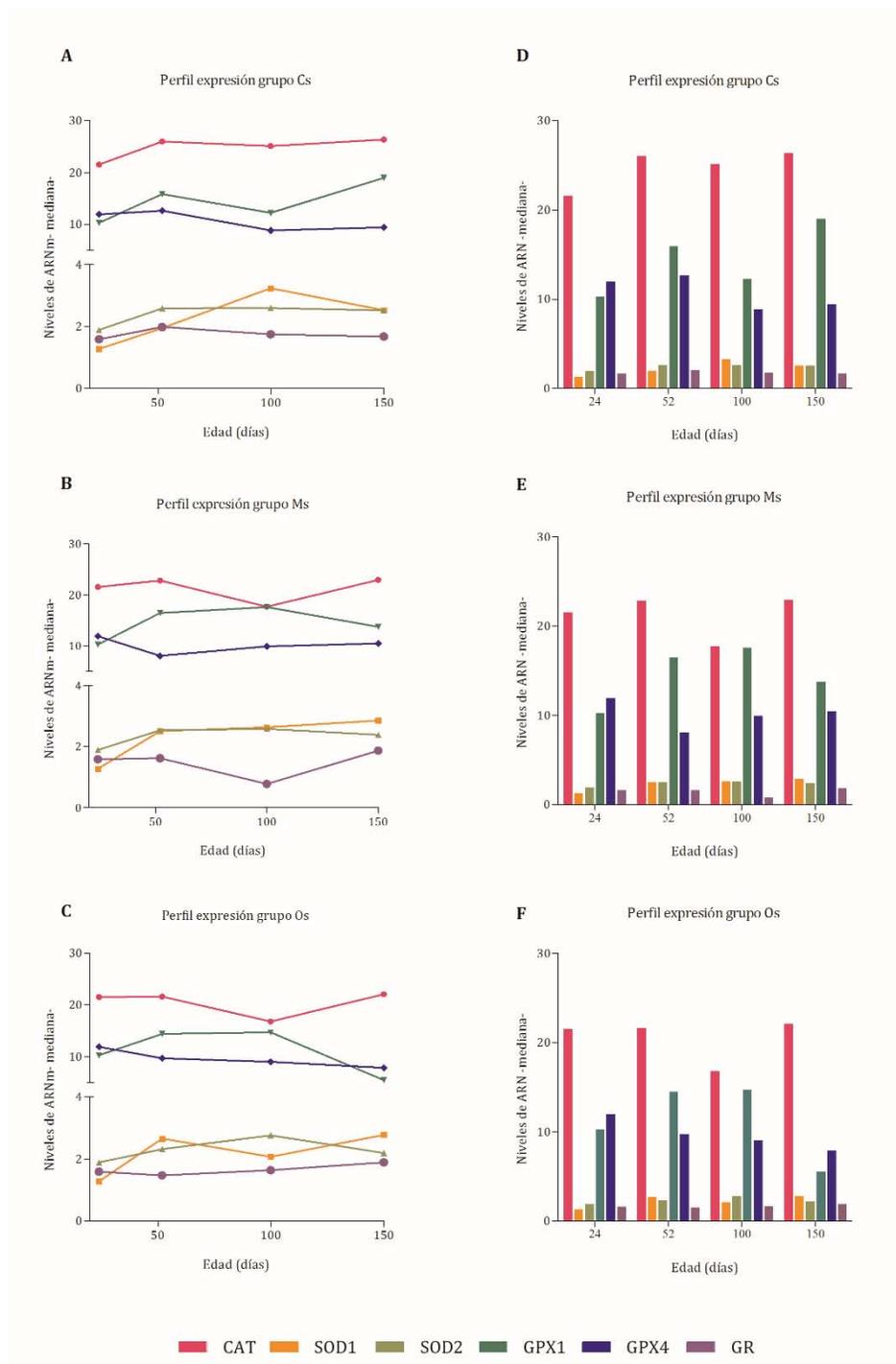
Edad (días)	Grupo	Hígado										Glándula mamaria													
		CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR	CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR												
24	Cs	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		M ± DE	110,18 ± 30,58	7,54 ± 2,50	1,79 ± 0,39	32,62 ± 8,17	8,04 ± 1,51	2,12 ± 0,49	27,25 ± 12,64	1,30 ± 0,22	1,76 ± 1,25	9,98 ± 1,40	12,76 ± 4,10	1,66 ± 0,29	27,25 ± 12,64	1,30 ± 0,22	1,76 ± 1,25	9,98 ± 1,40	12,76 ± 4,10	1,66 ± 0,29	27,25 ± 12,64	1,30 ± 0,22	1,76 ± 1,25	9,98 ± 1,40	12,76 ± 4,10
		perc. 5-95	76,28 - 148,75	4,78 - 10,92	1,38 - 2,46	20,74 - 40,67	6,43 - 10,38	1,66 - 2,96	19,09 - 44,71	1,12 - 1,59	0,37 - 3,20	8,16 - 11,30	9,46 - 18,26	1,33 - 1,95	19,09 - 44,71	1,12 - 1,59	0,37 - 3,20	8,16 - 11,30	9,46 - 18,26	1,33 - 1,95	19,09 - 44,71	1,12 - 1,59	0,37 - 3,20	8,16 - 11,30	9,46 - 18,26
52	Cs	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		M ± DE	137,16 ± 36,08	15,75 ± 4,08	2,09 ± 0,38	53,40 ± 15,44	9,33 ± 1,33	2,35 ± 0,57	23,82 ± 11,75	2,29 ± 1,40	2,88 ± 1,01	16,67 ± 4,39	12,68 ± 3,23	1,81 ± 0,67	23,82 ± 11,75	2,29 ± 1,40	2,88 ± 1,01	16,67 ± 4,39	12,68 ± 3,23	1,81 ± 0,67	23,82 ± 11,75	2,29 ± 1,40	2,88 ± 1,01	16,67 ± 4,39	12,68 ± 3,23
		perc. 5-95	91,96 - 181,64	11,40 - 21,91	1,48 - 2,47	32,73 - 73,99	8,25 - 11,58	1,58 - 3,16	4,45 - 36,33	0,83 - 4,25	1,83 - 4,54	11,69 - 24,00	8,31 - 16,56	0,87 - 2,57	4,45 - 36,33	0,83 - 4,25	1,83 - 4,54	11,69 - 24,00	8,31 - 16,56	0,87 - 2,57	4,45 - 36,33	0,83 - 4,25	1,83 - 4,54	11,69 - 24,00	8,31 - 16,56
100	Ms	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		M ± DE	150,48 ± 29,00	16,33 ± 6,15	2,15 ± 0,20	71,74 ± 9,39	10,34 ± 1,25	2,21 ± 0,36	23,01 ± 10,16	2,53 ± 1,00	2,50 ± 0,77	16,22 ± 3,91	9,36 ± 4,17	1,63 ± 0,35	23,01 ± 10,16	2,53 ± 1,00	2,50 ± 0,77	16,22 ± 3,91	9,36 ± 4,17	1,63 ± 0,35	23,01 ± 10,16	2,53 ± 1,00	2,50 ± 0,77	16,22 ± 3,91	9,36 ± 4,17
		perc. 5-95	112,58 - 188,20	9,35 - 25,75	1,88 - 2,42	58,83 - 83,52	8,78 - 12,04	1,79 - 2,70	9,12 - 36,69	1,34 - 4,07	1,51 - 3,65	10,35 - 21,32	5,89 - 15,92	1,13 - 2,05	9,12 - 36,69	1,34 - 4,07	1,51 - 3,65	10,35 - 21,32	5,89 - 15,92	1,13 - 2,05	9,12 - 36,69	1,34 - 4,07	1,51 - 3,65	10,35 - 21,32	5,89 - 15,92
150	Os	n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		M ± DE	149,96 ± 24,81	19,64 ± 7,60	2,09 ± 0,25	76,11 ± 12,26	9,71 ± 1,16	2,19 ± 0,27	22,87 ± 8,25	2,54 ± 0,60	2,58 ± 0,91	15,36 ± 5,98	11,23 ± 5,89	1,47 ± 0,36	22,87 ± 8,25	2,54 ± 0,60	2,58 ± 0,91	15,36 ± 5,98	11,23 ± 5,89	1,47 ± 0,36	22,87 ± 8,25	2,54 ± 0,60	2,58 ± 0,91	15,36 ± 5,98	11,23 ± 5,89
		perc. 5-95	120,85 - 188,79	11,96 - 31,71	1,77 - 2,43	60,98 - 94,85	8,52 - 11,47	1,82 - 2,56	13,71 - 36,19	1,60 - 3,21	1,46 - 4,03	9,43 - 24,37	3,82 - 18,63	0,93 - 1,91	13,71 - 36,19	1,60 - 3,21	1,46 - 4,03	9,43 - 24,37	3,82 - 18,63	0,93 - 1,91	13,71 - 36,19	1,60 - 3,21	1,46 - 4,03	9,43 - 24,37	3,82 - 18,63
200	Cs	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	176,04 ± 19,09	29,32 ± 7,51	2,68 ± 0,28	101,72 ± 13,72	10,84 ± 1,50	2,51 ± 0,19	25,24 ± 10,02	2,90 ± 0,57	2,67 ± 1,04	13,01 ± 2,37	9,38 ± 1,27	1,54 ± 0,61	25,24 ± 10,02	2,90 ± 0,57	2,67 ± 1,04	13,01 ± 2,37	9,38 ± 1,27	1,54 ± 0,61	25,24 ± 10,02	2,90 ± 0,57	2,67 ± 1,04	13,01 ± 2,37	9,38 ± 1,27
		perc. 5-95	159,47 - 196,83	21,05 - 36,41	2,32 - 2,95	88,94 - 119,42	9,44 - 12,79	2,29 - 2,71	13,72 - 37,04	2,22 - 3,37	1,85 - 4,05	10,45 - 15,82	8,49 - 11,13	0,73 - 2,07	13,72 - 37,04	2,22 - 3,37	1,85 - 4,05	10,45 - 15,82	8,49 - 11,13	0,73 - 2,07	13,72 - 37,04	2,22 - 3,37	1,85 - 4,05	10,45 - 15,82	8,49 - 11,13
300	Ms	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	165,86 ± 15,57	27,14 ± 3,45	2,20 ± 0,25	89,24 ± 7,90	10,86 ± 0,62	2,29 ± 0,34	20,34 ± 5,15	2,98 ± 0,85	2,65 ± 0,83	16,46 ± 3,32	10,16 ± 2,71	0,73 ± 0,09	20,34 ± 5,15	2,98 ± 0,85	2,65 ± 0,83	16,46 ± 3,32	10,16 ± 2,71	0,73 ± 0,09	20,34 ± 5,15	2,98 ± 0,85	2,65 ± 0,83	16,46 ± 3,32	10,16 ± 2,71
		perc. 5-95	148,04 - 183,85	24,13 - 31,21	1,86 - 2,37	80,28 - 98,60	10,24 - 11,66	2,00 - 2,74	15,76 - 26,56	2,26 - 4,05	1,80 - 3,71	12,45 - 19,88	6,87 - 12,76	0,62 - 0,80	15,76 - 26,56	2,26 - 4,05	1,80 - 3,71	12,45 - 19,88	6,87 - 12,76	0,62 - 0,80	15,76 - 26,56	2,26 - 4,05	1,80 - 3,71	12,45 - 19,88	6,87 - 12,76
400	Os	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	160,09 ± 27,36	29,89 ± 7,75	2,40 ± 0,46	115,78 ± 14,41	10,77 ± 1,74	2,42 ± 0,58	18,27 ± 4,68	2,45 ± 0,86	2,99 ± 0,55	15,64 ± 4,31	9,34 ± 3,17	1,70 ± 0,51	18,27 ± 4,68	2,45 ± 0,86	2,99 ± 0,55	15,64 ± 4,31	9,34 ± 3,17	1,70 ± 0,51	18,27 ± 4,68	2,45 ± 0,86	2,99 ± 0,55	15,64 ± 4,31	9,34 ± 3,17
		perc. 5-95	131,95 - 193,99	19,37 - 35,50	2,08 - 3,03	100,57 - 133,54	8,54 - 12,36	1,81 - 3,12	13,77 - 23,79	1,91 - 3,64	2,47 - 3,63	11,61 - 21,10	6,27 - 13,41	1,27 - 2,38	13,77 - 23,79	1,91 - 3,64	2,47 - 3,63	11,61 - 21,10	6,27 - 13,41	1,27 - 2,38	13,77 - 23,79	1,91 - 3,64	2,47 - 3,63	11,61 - 21,10	6,27 - 13,41
500	Cs	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	166,52 ± 36,94	33,81 ± 7,65	2,64 ± 0,48	145,88 ± 36,60	13,93 ± 2,99	2,83 ± 0,87	24,53 ± 8,10	2,72 ± 0,44	2,69 ± 0,40	18,86 ± 2,61	9,75 ± 2,46	1,71 ± 0,41	24,53 ± 8,10	2,72 ± 0,44	2,69 ± 0,40	18,86 ± 2,61	9,75 ± 2,46	1,71 ± 0,41	24,53 ± 8,10	2,72 ± 0,44	2,69 ± 0,40	18,86 ± 2,61	9,75 ± 2,46
		perc. 5-95	132,77 - 215,46	24,20 - 40,77	2,11 - 3,20	115,57 - 193,58	11,19 - 17,59	1,93 - 3,78	14,98 - 33,67	2,28 - 3,22	2,31 - 3,19	15,89 - 21,95	7,02 - 12,72	1,29 - 2,23	14,98 - 33,67	2,28 - 3,22	2,31 - 3,19	15,89 - 21,95	7,02 - 12,72	1,29 - 2,23	14,98 - 33,67	2,28 - 3,22	2,31 - 3,19	15,89 - 21,95	7,02 - 12,72
600	Ms	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	160,24 ± 32,22	29,05 ± 5,42	2,51 ± 0,29	113,94 ± 16,80	14,00 ± 1,64	2,37 ± 0,18	20,96 ± 6,84	2,76 ± 0,35	2,73 ± 0,61	18,39 ± 8,32	10,13 ± 0,99	1,86 ± 0,15	20,96 ± 6,84	2,76 ± 0,35	2,73 ± 0,61	18,39 ± 8,32	10,13 ± 0,99	1,86 ± 0,15	20,96 ± 6,84	2,76 ± 0,35	2,73 ± 0,61	18,39 ± 8,32	10,13 ± 0,99
		perc. 5-95	124,00 - 193,41	23,83 - 35,44	2,15 - 2,79	99,70 - 133,98	12,33 - 16,08	2,17 - 2,58	13,34 - 27,71	2,31 - 3,09	2,31 - 3,56	11,65 - 29,21	8,78 - 10,82	1,68 - 2,01	13,34 - 27,71	2,31 - 3,09	2,31 - 3,56	11,65 - 29,21	8,78 - 10,82	1,68 - 2,01	13,34 - 27,71	2,31 - 3,09	2,31 - 3,56	11,65 - 29,21	8,78 - 10,82
700	Os	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	153,85 ± 34,04	26,15 ± 6,43	2,23 ± 0,26	124,49 ± 25,79	12,08 ± 1,50	2,68 ± 0,38	22,12 ± 4,78	2,67 ± 0,23	2,20 ± 0,73	7,17 ± 4,08	7,88 ± 1,29	1,76 ± 0,30	22,12 ± 4,78	2,67 ± 0,23	2,20 ± 0,73	7,17 ± 4,08	7,88 ± 1,29	1,76 ± 0,30	22,12 ± 4,78	2,67 ± 0,23	2,20 ± 0,73	7,17 ± 4,08	7,88 ± 1,29
		perc. 5-95	115,44 - 193,40	19,45 - 33,16	2,02 - 2,58	97,28 - 151,89	10,49 - 13,79	2,28 - 3,11	15,94 - 26,38	2,36 - 2,87	1,40 - 3,07	4,35 - 12,79	6,63 - 9,54	1,43 - 2,07	15,94 - 26,38	2,36 - 2,87	1,40 - 3,07	4,35 - 12,79	6,63 - 9,54	1,43 - 2,07	15,94 - 26,38	2,36 - 2,87	1,40 - 3,07	4,35 - 12,79	6,63 - 9,54
800	Os	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		M ± DE	148,99 ± 18,99	27,66 ± 6,66	2,14 ± 0,14	123,15 ± 12,56	12,56 ± 1,56	2,66 ± 0,66	22,06 ± 6,66	2,78 ± 0,78	2,19 ± 0,19	5,52 ± 1,52	7,88 ± 1,29	1,76 ± 0,30	22,06 ± 6,66	2,78 ± 0,78	2,19 ± 0,19	5,52 ± 1,52	7,88 ± 1,29	1,76 ± 0,30	22,06 ± 6,66	2,78 ± 0,78	2,19 ± 0,19	5,52 ± 1,52	7,88 ± 1,29
		perc. 5-95	148,99 ± 18,99	27,66 ± 6,66	2,14 ± 0,14	123,15 ± 12,56	12,56 ± 1,56	2,66 ± 0,66	22,06 ± 6,66	2,78 ± 0,78	2,19 ± 0,19	5,52 ± 1,52	7,88 ± 1,29	1,76 ± 0,30	22,06 ± 6,66	2,78 ± 0,78	2,19 ± 0,19	5,52 ± 1,52	7,88 ± 1,29	1,76 ± 0,30	22,06 ± 6,66	2,78 ± 0,78	2,19 ± 0,19	5,52 ± 1,52	7,88 ± 1,29

Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; m: mediana; perc. 5-95: percentiles 5 y 95.

# Resultados



**Figura 24. Perfil de expresión de las enzimas antioxidantes en hígado de animales sanos a diferentes edades según el tipo de dieta administrada. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.**



**Figura 25. Perfil de expresión de las enzimas antioxidantes en glándula mamaria de animales sanos a diferentes edades según el tipo de dieta administrada.** Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

## Resultados

**Tabla 6. Análisis estadístico del estudio de la expresión a lo largo del tiempo de las diferentes enzimas antioxidantes en hígado y glándula mamaria de animales sanos.**

	SOD1 vs.					SOD2 vs.				CAT vs.			GPX1 vs.		GPX4 vs.
	SOD2	CAT	GPX1	GPX4	GR	CAT	GPX1	GPX4	GR	GPX1	GPX4	GR	GPX4	GR	GR
Hígado	Cs	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**
	Ms	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**
	Os	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**
G. Mamaria	Cs	0,564	0,046**	0,046**	0,046**	1	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**
	Ms	1	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**
	Os	1	0,046**	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	1	0,046**	0,046**

Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*\*:  $p < 0.05$ ; \*:  $0.05 < p < 1$ ; test no paramétrico de Friedman.

**Tabla 7. Análisis estadístico de la comparación de la expresión de las enzimas antioxidantes a lo largo del tiempo entre hígado y glándula mamaria de animales sanos.**

	CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR
Cs	0,046**	0,046**	1,000	0,046**	1,000	0,317
Ms	0,046**	0,046**	0,317	0,046**	0,317	0,046**
Os	0,046**	0,046**	0,046**	0,046**	1,000	0,046**

Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*\*:  $p < 0.05$ ; \*:  $0.05 < p < 1$ ; test no paramétrico de Friedman.

Finalmente, se analizaron los cambios producidos en la expresión de cada una de las enzimas antioxidantes por efecto de la edad. Así, se comprobó que, en hígado, las enzimas CAT y GR mantuvieron su expresión constante y sin diferencias por efecto de la edad, independientemente del tipo de dieta. En cambio, las enzimas SOD1 y SOD2 aumentaron sus niveles de ARNm hasta los 100 días de edad para luego estabilizarse. El aumento de SOD1 ocurrió en todos los grupos experimentales, mientras que el aumento de SOD2 sólo se observó en la dieta normolipídica (Tablas 5 y 9, Figura 24).

En glándula mamaria la expresión de las enzimas CAT y SOD2 fue constante a lo largo de la vida de los animales, independientemente del tipo de dieta. En el resto de las enzimas se obtuvieron algunas diferencias en determinados grupos experimentales, pero sin una tendencia clara por efecto de la edad (Tablas 5 y 9, Figura 25).

Tabla 8. Análisis estadístico del estudio de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes en cada una de las edades estudiadas en hígado y glándula mamaria de animales sanos.

Edad (días)	Grupo	CAT vs.			SOD1 vs.			SOD2 vs.			GPX1 vs.			GPX4 vs.			
		GPX1	SOD1	GPX4	GR	SOD2	GPX1	GPX4	GR	CAT	GPX1	GPX4	GR	GPX4	GR	GPX4	GR
24	Cos	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cs	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
	Ms	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
	Os	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
100	Cs	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Ms	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Os	0,016**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cs	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
150	Ms	0,028**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cs	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Os	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cos	0,009**	0,117	0,028**	0,009**	0,602	0,009**	0,009**	0,059*	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
52	Cs	0,059*	0,059*	0,019**	0,002**	0,273	0,000**	0,000**	0,545	0,002**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
	Ms	0,028**	0,003**	0,005**	0,000**	0,880	0,000**	0,000**	0,013**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**
	Os	0,016**	0,226	0,004**	0,000**	0,762	0,000**	0,002**	0,001**	0,000**	0,000**	0,000**	0,001**	0,003**	0,001**	0,000**	0,001**
	Cs	0,076*	0,016**	0,009**	0,009**	0,463	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
100	Ms	0,347	0,028**	0,009**	0,009**	0,465	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cs	0,347	0,028**	0,016**	0,009**	0,117	0,009**	0,009**	0,076*	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Os	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	1,000	0,009**	0,009**	0,016**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,016**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cs	0,465	0,009**	0,009**	0,009**	0,917	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
150	Ms	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cs	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Os	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**
	Cos	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,175	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**	0,009**

Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano. \*\*, p<0,05; \*, 0,05<p<0,1; test no paramétrico U de Mann-Whitney.

## Resultados

**Tabla 9. Análisis estadístico de los cambios en la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes por efecto de la edad en hígado y glándula mamaria de animales sanos.**

	24 vs. 52			52 vs. 100			100 vs. 150			
	Cs	Ms	Os	Cs	Ms	Os	Cs	Ms	Os	
Hígado	SOD1	0,002**	0,002**	0,002**	0,004**	0,007**	0,050*	0,250	0,754	0,347
	SOD2	0,141	0,050*	0,066*	0,010**	0,390	0,125	0,91681	0,074*	0,464
	CAT	0,902	0,462	0,391	0,050*	0,327	0,327	0,347	0,916	0,601
	GPX1	0,014**	0,002**	0,002**	0,002**	0,007**	0,002**	0,028**	0,016**	0,601
	GPX4	0,177	0,0274	0,111	0,050*	0,462	0,220	0,047**	0,009**	0,173
	GR	0,270	0,141	0,141	0,500	0,425	0,462	0,916	0,464	0,529
G. Mamaria	SOD1	0,623	0,010**	0,003**	0,390	0,327	0,540	0,529	0,916	0,174
	SOD2	0,177	0,270	0,270	0,580	0,854	0,270	0,753	0,754	0,075*
	CAT	0,806	0,806	0,540	0,806	0,391	0,391	0,916	0,916	0,347
	GPX1	0,007**	0,014**	0,014**	0,066*	0,806	0,902	0,016**	0,916	0,028**
	GPX4	0,713	0,037*	0,391	0,037**	0,391	0,624	0,754	0,916	0,347
	GR	0,624	1,000	0,220	0,327	0,002**	0,667	0,916	0,009**	0,463

Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*\*:  $p < 0,05$ ; \*:  $0,05 < p < 1$  test no paramétrico U de Mann-Whitney.

### 1.2.1.2. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO

Este estudio se realizó con los datos obtenidos de las muestras de los siguientes sacrificios: 52, 54, 55, 58, 63, 100 y 150 días.

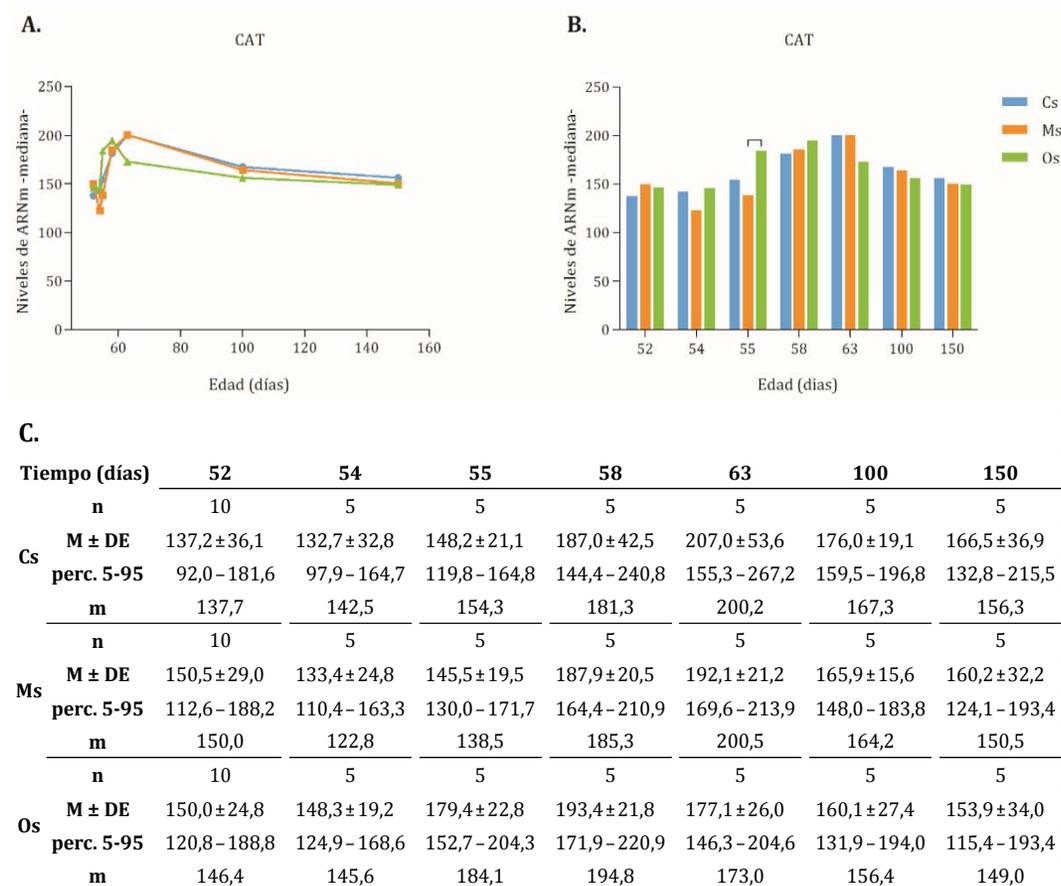
#### 1.2.1.2.1. Expresión génica

Se determinaron los niveles de expresión del ARNm de las enzimas estudiadas mediante 2 tipos de análisis: A) comparación entre grupos experimentales a lo largo del tiempo (test de Friedman); y B) comparación en cada una de las edades estudiadas (test U de Mann-Whitney).

- **Catalasa**

En general no se observaron cambios de expresión del enzima CAT a lo largo del tiempo por efecto de los lípidos de la dieta (Figura 26 A, C). Únicamente a día 55 el

grupo alimentado con la dieta de aceite de oliva mostró unos niveles superiores de expresión respecto al de la dieta de aceite de maíz (Figura 26 B, C).



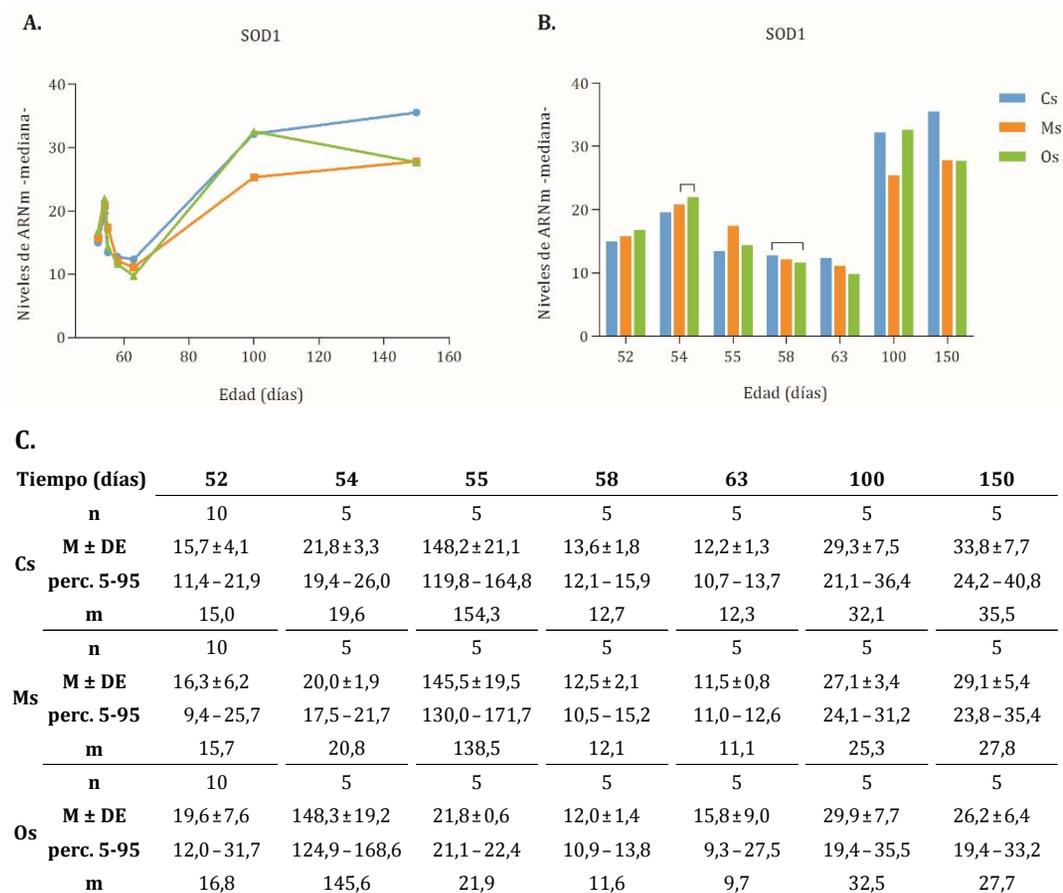
**Figura 26. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en hígado de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Superóxido dismutasa 1

El análisis de la expresión de SOD1 a lo largo del tiempo no mostró diferencias entre los diferentes grupos experimentales (Figura 27 A, C). En cambio, en dos edades concretas sí se observaron diferencias por efecto de los lípidos de la dieta. Así, a día 54 la dieta de aceite de oliva provocó un aumento de expresión de SOD1 respecto a la dieta de aceite de maíz (Figura 27 B, C). A día 58, en cambio, esta

## Resultados

misma dieta se asoció a unos niveles de expresión inferiores a los de la dieta control, situación que se repitió a día 63, aunque no de manera significativa. A partir de día 100 los niveles de expresión se duplicaron respecto a los de 63 días en todos los grupos experimentales, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.



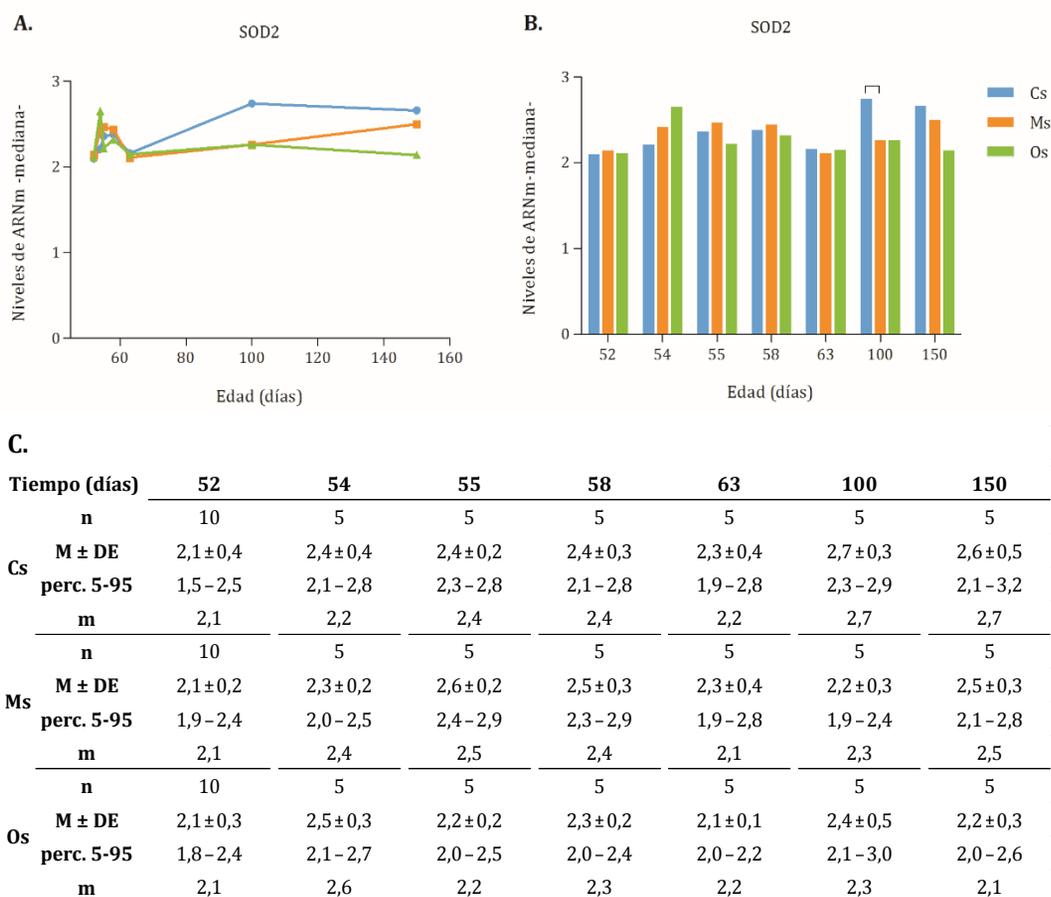
**Figura 27. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en hígado de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

- **Superóxido dismutasa 2**

En relación a la expresión de SOD2, los lípidos de la dieta tampoco provocaron cambios significativos a lo largo del tiempo (Figura 28 B, C). A día 100, sin embargo,

los grupos de dieta hiperlipídica mostraron niveles inferiores a los del grupo control, aunque únicamente la diferencias con el grupo de aceite de maíz fue estadísticamente significativa (Figura 28 A, C).

Por otra parte, no se halló correlación entre la expresión de SOD2 y la de SOD1 (Anexo Tabla 2).



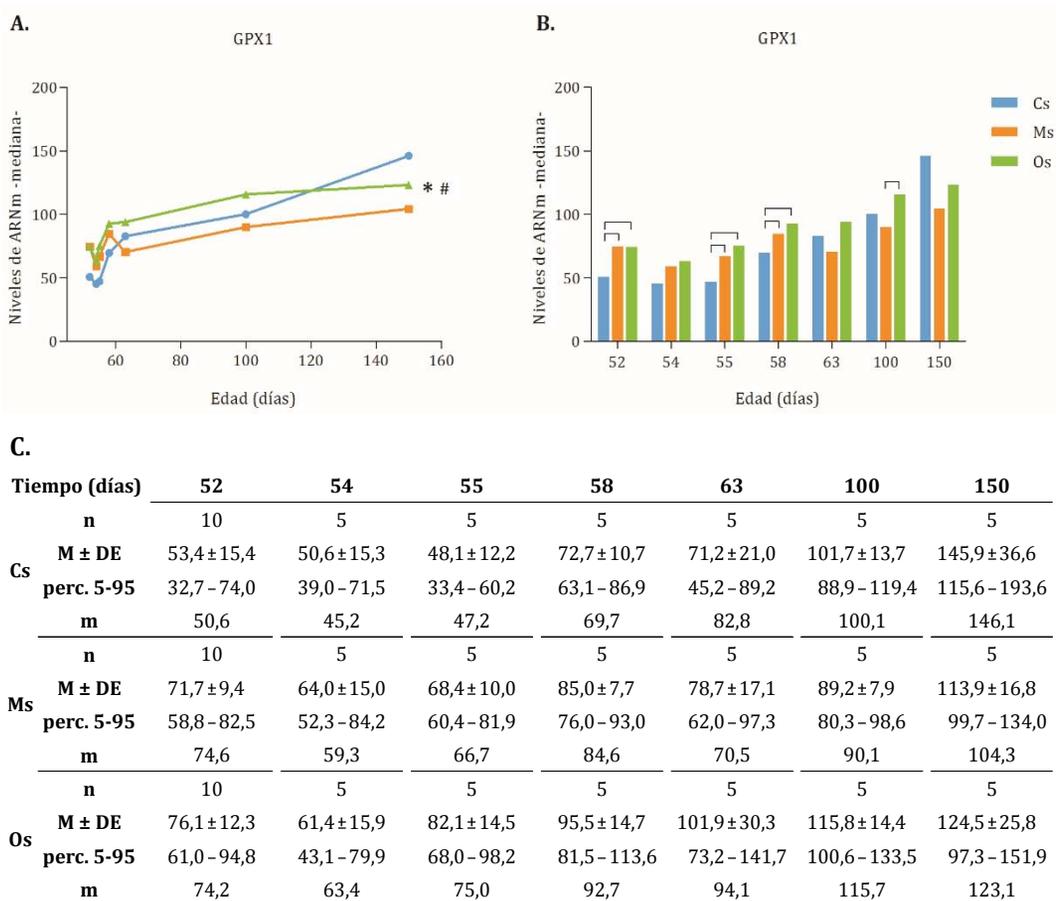
**Figura 28. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en hígado de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; □: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Glutación peroxidasa 1

Los resultados del análisis de la expresión de GPX1 mostraron una tendencia de la dieta de aceite de oliva a aumentar dicha expresión a lo largo del tiempo respecto

## Resultados

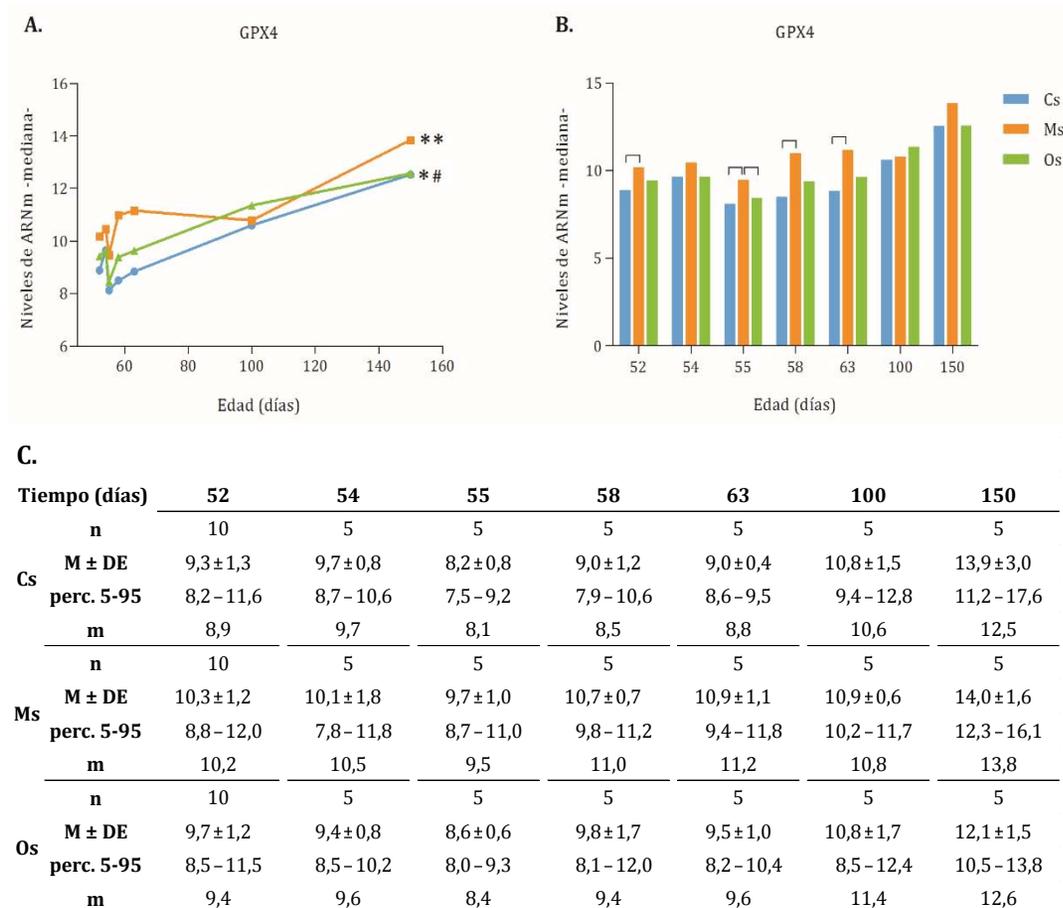
a las otras dos dietas (Figura 29 A, C). Además, a 52, 55 y 58 días de edad, los animales alimentados con dietas hiperlipídicas mostraron unos niveles de expresión significativamente superiores a los de los animales control. A 54 días, se observó la misma tendencia (Figura 29 B, C). A partir de día 63, el patrón de expresión cambió y la dieta de aceite de maíz se asoció a unos niveles de expresión inferiores en comparación a las otras dietas, aunque solo de manera significativa a día 100 respecto a la dieta de aceite de oliva.



**Figura 29. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en hígado de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*, #:  $p < 0.1$  vs. Cs; #:  $p < 0.1$  vs. Ms; test de Friedman. —:  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Glutación peroxidasa 4

La dieta de aceite de maíz aumentó la expresión de GPX4 a lo largo del tiempo, de forma significativa respecto al grupo control y cercano a la significación respecto a la dieta de aceite de oliva (Figura 30 A, C). Al realizar el análisis en cada una de las edades, los resultados mostraron que en todas ellas, excepto a día 100, la expresión en el grupo Ms fue superior, significativamente a la del control a día 52, 55, 58 y 63. A día 55 además, dicha expresión también fue superior a la del grupo de aceite de oliva (Figura 30 B, C)



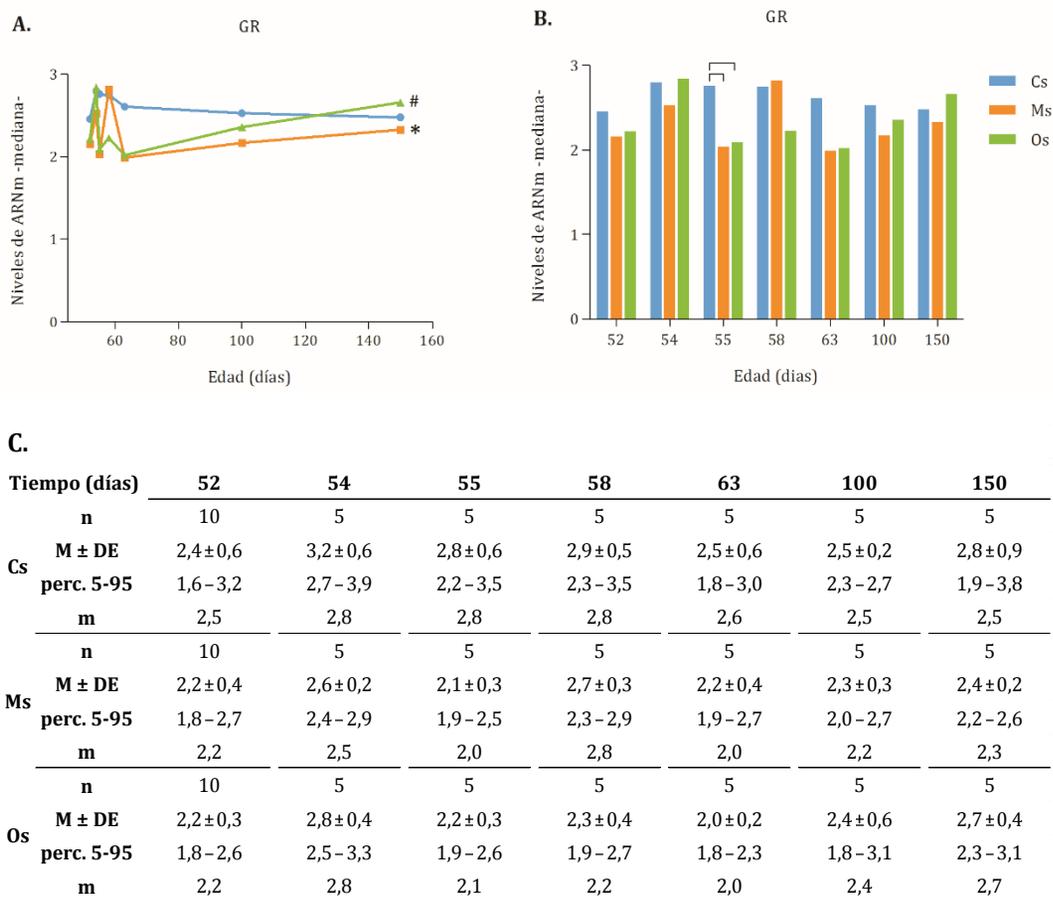
**Figura 30. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en hígado de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*\*:  $p < 0.05$  vs. Cs; \*:  $p < 0.1$  vs. Cs; #:  $p < 0.1$  vs. Ms; test de Friedman.  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## *Resultados*

Por otra parte, los niveles de expresión de GPX4 se hallaron correlacionados positivamente con los de GPX1 en el grupo de aceite de oliva a 54, 55 y 58 días con un p-valor de 0.05; y grupo en el grupo control a 55 días donde correlacionaron positiva y significativamente (Anexo Tabla 3).

- **Glutación reductasa**

Respecto a los niveles de ARNm de la enzima GR, no se observaron cambios significativos debidos a los lípidos de la dieta a lo largo del tiempo, aunque la dieta de aceite maíz tendió a presentar valores inferiores a los de las dietas control y de aceite de oliva (Figura 31 A, C). Esta misma tendencia se observó al realizar el análisis individual en cada edad. Excepto a día 58, los niveles del grupo de aceite de maíz tendieron a ser inferiores a los del control. La dieta de aceite de oliva también tendió a presentar niveles inferiores a los del control, excepto a día 54 y 150, donde mostró unos niveles similares o ligeramente superiores. A día 55, ambas dietas hiperlipídicas provocaron unos niveles de expresión significativamente inferiores a los de la dieta control (Figura 31 C, B).



**Figura 31. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en hígado de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*:  $p < 0.1$  vs. Cs; #:  $p < 0.1$  vs. Ms; test de Friedman  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 1.2.1.2.2. Actividad enzimática

Para profundizar en el estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre la capacidad antioxidante enzimática, también se determinaron los niveles de actividad de las enzimas CAT, SOD y GPX. En el caso de SOD y GPX, se consideró que la actividad obtenida fue el resultado de la suma de actividades de sus correspondientes isoformas.

- **Catalasa**

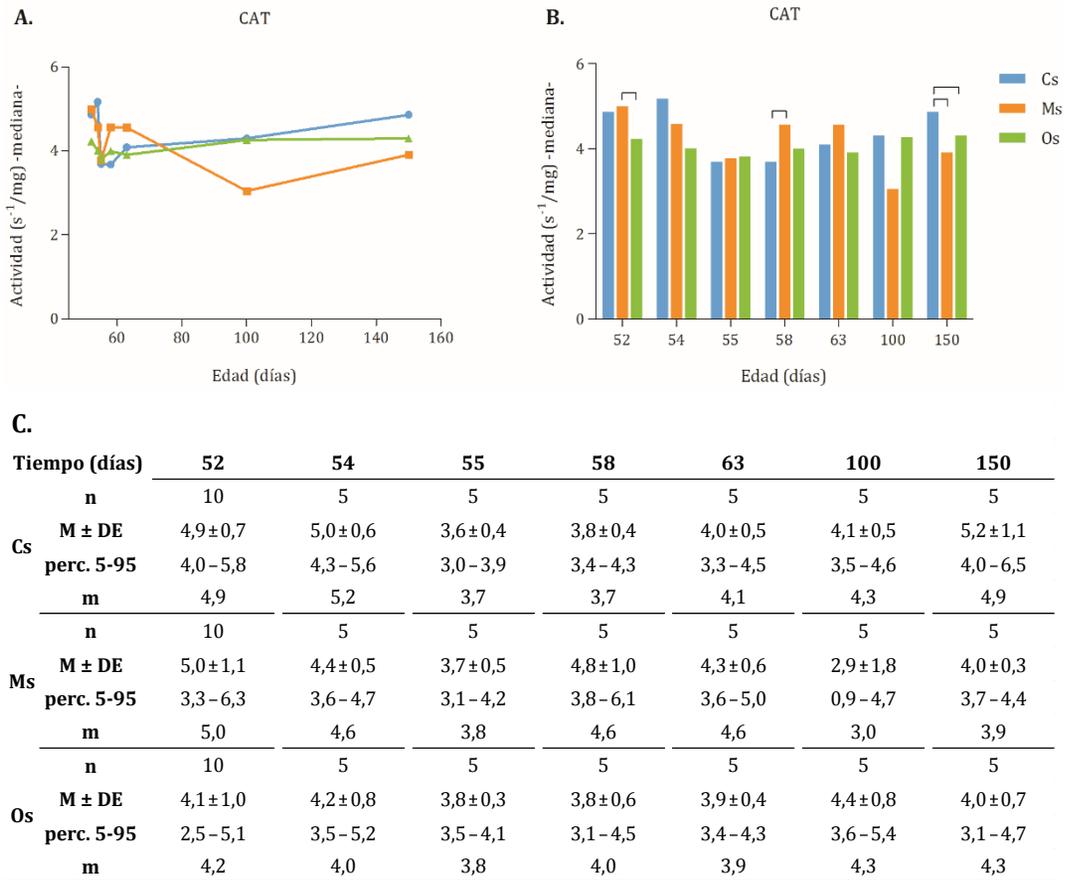
El análisis de la actividad CAT a lo largo del tiempo no mostró diferencias entre grupos experimentales (Figura 32 A, C). En cambio, en determinadas edades sí se observaron cambios en función de la dieta administrada (Figura 32 B, C). Así, a día 52, la dieta de aceite de maíz se asoció a unos niveles significativamente superiores de actividad respecto a la dieta de aceite de oliva. A día 58 y día 63, la dieta de aceite de maíz también provocó el aumento de la actividad CAT respecto a los otros dos tipos de dieta, pero sólo de manera significativa a 58 días respecto a la dieta control. A día 100 y día 150, el patrón de actividad se invirtió de manera que la dieta de aceite de maíz se asoció a unos niveles inferiores respecto las otras dos dietas, siendo las diferencias significativas a día 150. A esta edad, los dos grupos de dietas hiperlipídicas presentaron una actividad CAT significativamente inferior respecto al control.

Por otra parte, no se halló ninguna correlación entre los niveles de expresión y actividad de dicha enzima (Anexo Tabla 1).

- **Superóxido dismutasa**

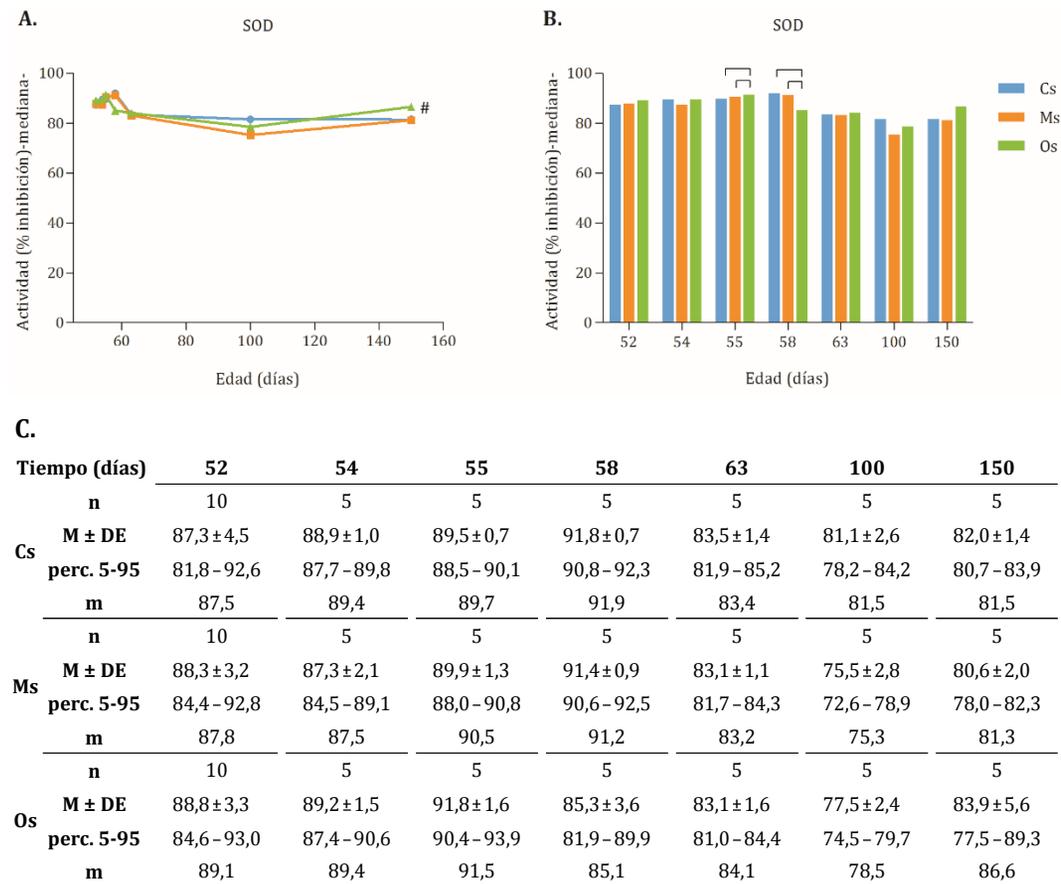
Los resultados de la actividad SOD total a lo largo del tiempo únicamente mostraron una tendencia a unos niveles superiores debido a la dieta de aceite de oliva respecto a la dieta de aceite de maíz (Figura 33 A, C). Tampoco se apreciaron grandes diferencias entre los niveles de actividad de los diferentes grupos en edades concretas (Figura 33 B, C). A día 55, la dieta de aceite de oliva se asoció a un aumento significativo respecto a la dieta control y a la de aceite de maíz. A día 58, en cambio, el grupo de aceite de oliva presentó niveles inferiores a los otros dos grupos.

Los niveles de actividad de SOD no correlacionaron con los de la expresión de SOD1 y SOD2. Únicamente se obtuvo una correlación positiva significativa entre la expresión de SOD1 y la actividad SOD en el grupo de dieta de aceite de maíz a 52 días (Anexo Tabla 2).



**Figura 32. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de CAT en hígado de animales sanos.** A. Actividad a lo largo del tiempo. B. Actividad en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; s<sup>-1</sup>/mg: unidades de actividad enzimática relativizadas a mg de proteína □ □: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados

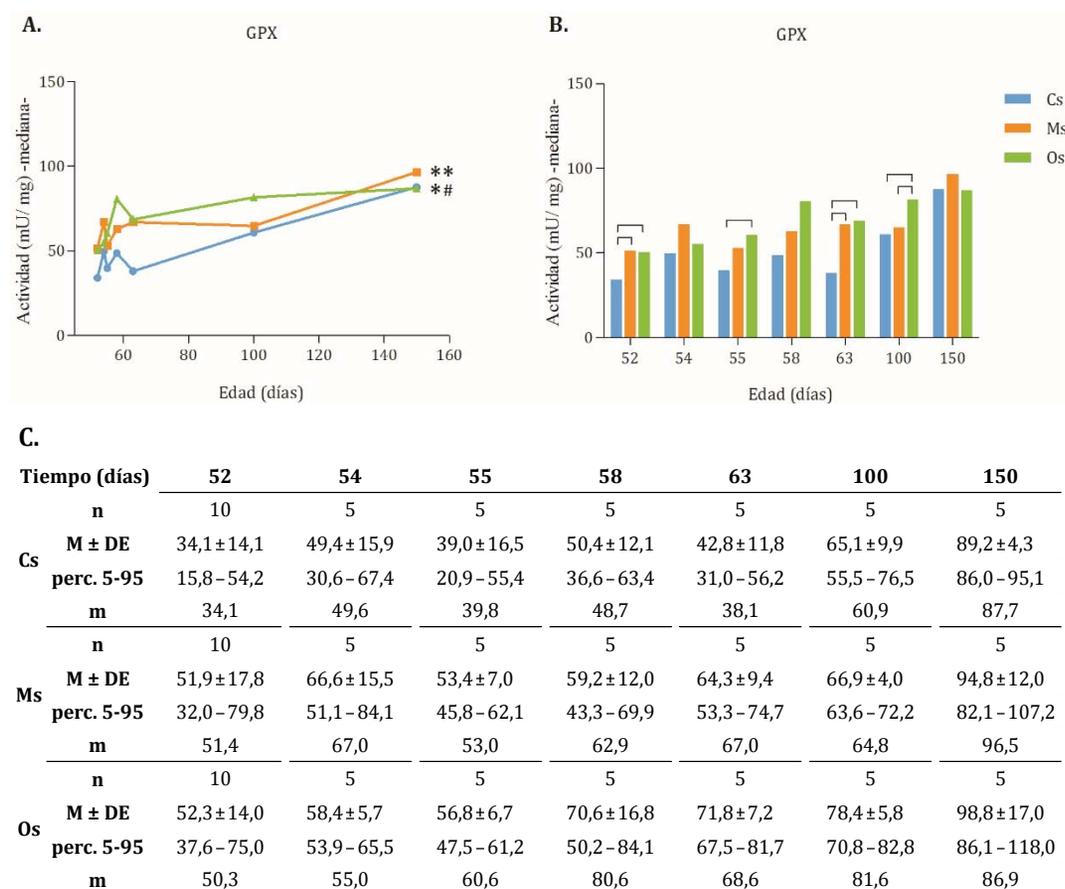


**Figura 33. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de SOD en hígado de animales sanos.** A. Actividad a lo largo del tiempo. B. Actividad en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; % inhibición: unidades de actividad enzimática. #:  $p < 0.1$  vs. Ms; test de Friedman.  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

- **Glutación peroxidasa**

La actividad GPX total a lo largo del tiempo fue distinta en función del grupo experimental. Así, la dieta de aceite de maíz presentó unos niveles significativamente superiores respecto a la dieta control, y la dieta de aceite de oliva tendió presentar mayor actividad respecto a la dieta control y menor actividad respecto a la dieta de aceite de maíz (Figura 34 A, C). El análisis de los resultados en cada una de las edades estudiadas mostró que los niveles de actividad debidos a la dieta de aceite de oliva fueron significativamente superiores a los del control hasta

día 100 (Figura 34 B, C). De hecho, las dietas hiperlipídicas se asociaron a una mayor actividad respecto a la dieta control en todos los sacrificios excepto a día 150, donde la dieta de aceite de oliva mostró unos niveles similares a los de la dieta control.



**Figura 34. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de GPX en hígado de animales sanos.** A. Actividad a lo largo del tiempo. B. Actividad en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; mU/mg: unidades de actividad enzimática relativizadas a mg de proteína; \*\* p<0.05 vs. Cs; \*; p<0.1 vs. Cs; #: p<0.1 vs. Ms; test de Friedman. - - : p< 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

Por otra parte, la actividad GPX no correlacionó significativamente con la expresión de cada isoforma. Únicamente a día 55, se observó una correlación positiva significativa entre la actividad y la expresión de GPX1 en el grupo de aceite de oliva; y a día 63, una correlación negativa significativa entre los niveles de la actividad y la expresión de GPX4 (Anexo Tabla 3).

### 1.2.1.2.3. Regulación de la expresión génica

Para profundizar en el estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre la capacidad antioxidante enzimática, especialmente sobre la expresión de GPX y GR, se analizaron los niveles del factor de transcripción NRF2 así como su estado de activación. En el primer caso se determinaron los niveles de proteína total NRF2, y en el segundo, los de NRF2 inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-NRF2 e inmunodetectado con un anticuerpo anti-KEAP1.

- **NRF2 total**

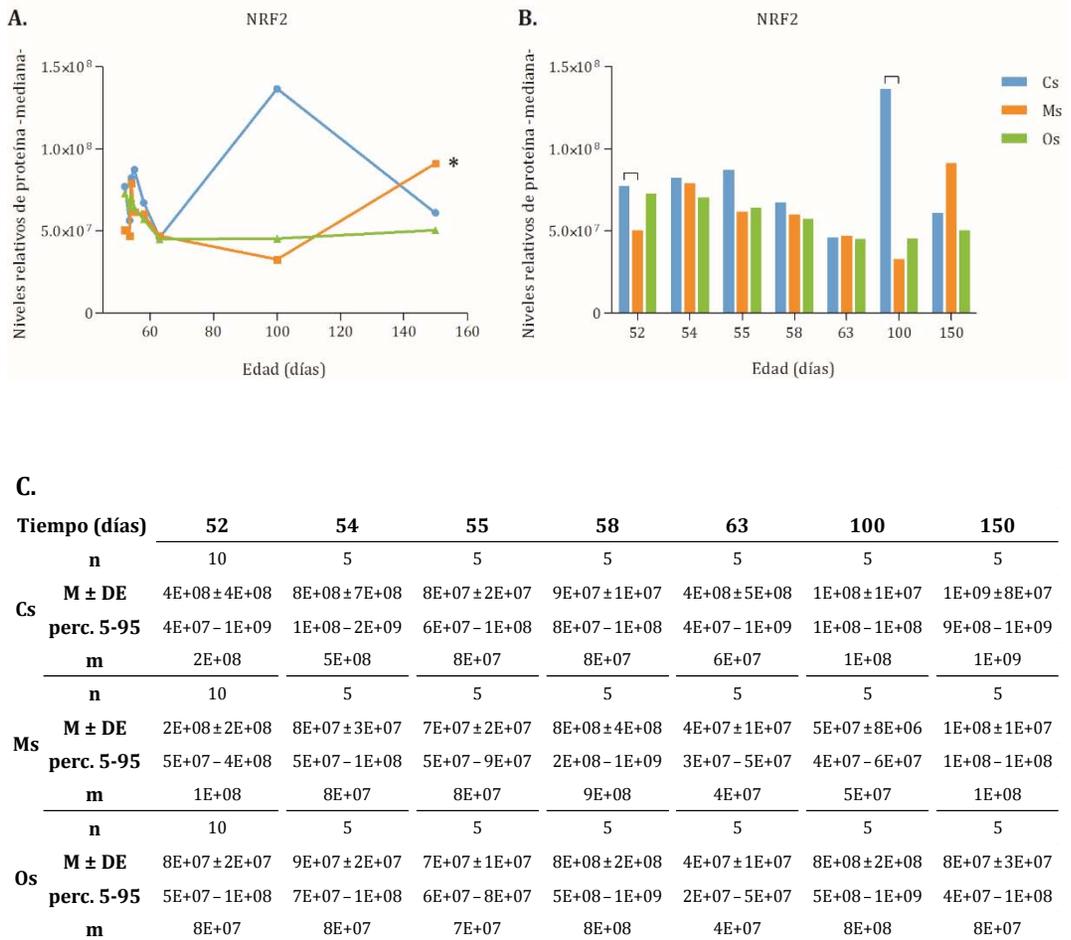
Al comparar los niveles totales de NRF2 a lo largo del tiempo entre los diferentes grupos experimentales, los resultados no mostraron diferencias significativas, aunque sí se observó una tendencia a la disminución debido a la dieta de aceite de maíz respecto a la control (Figura 35 A, C). A día 52 dicha disminución fue estadísticamente significativa (Figura 35 B). El cambio más notable se produjo a día 100 cuando el grupo control duplicó sus valores respecto a los de día 63, siendo la diferencia significativa respecto al grupo de aceite de maíz. En el resto de edades no se apreciaron cambios significativos entre grupo experimentales.

Por otra parte, los niveles de NRF2 correlacionaron positiva y significativamente con los niveles de expresión de GPX1 y GPX4 en el grupo de aceite de maíz a 55 días, y con GPX1 a esa misma edad en el grupo de aceite de oliva (Anexo Tabla 4).

- **Retención citoplasmática de NRF2**

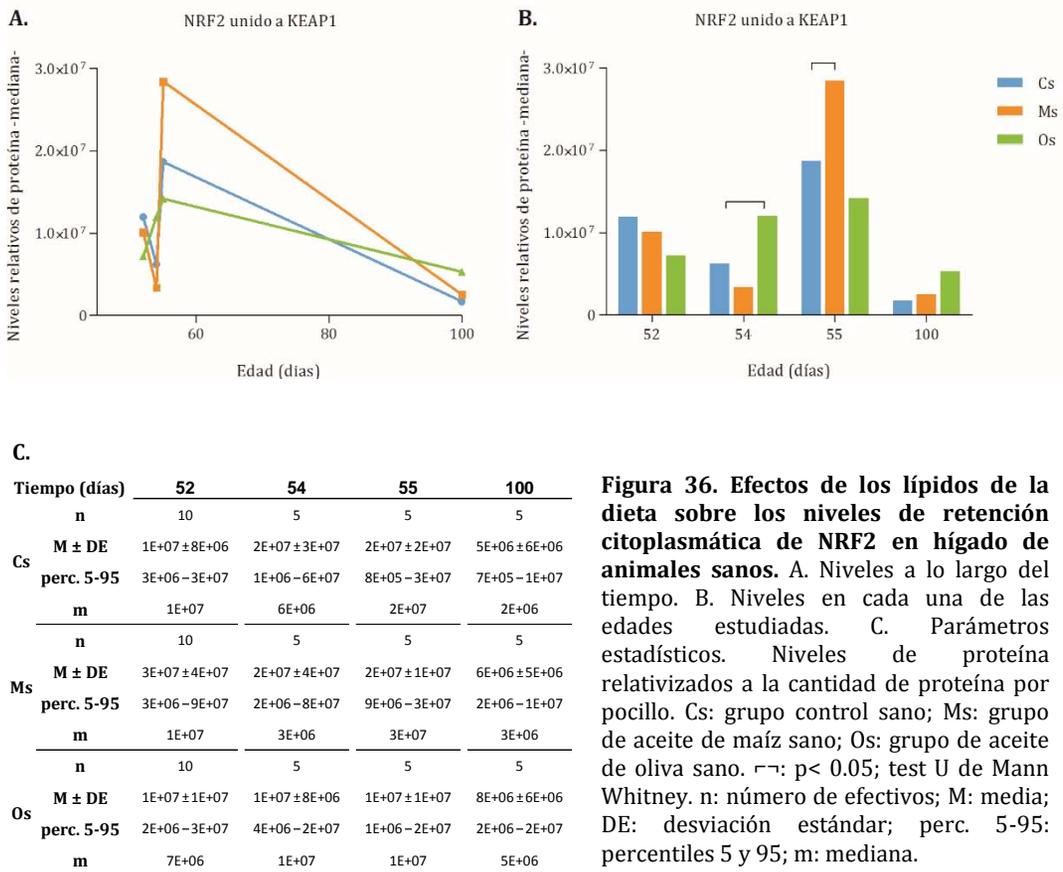
El grado de activación de NRF2 se analizó indirectamente a través de la determinación de los niveles del factor de transcripción inactivo, es decir, unido en citoplasma a KEAP1, mediante la técnica de inmunoprecipitación, en 4 edades diferentes. Los resultados no mostraron cambios en los niveles de retención citoplasmática de NRF2 a lo largo del tiempo debidos a los lípidos de la dieta (Figura 36 A, C). Sin embargo, a día 54 la dieta de aceite de oliva se asoció a un menor grado de activación de NRF2 respecto a la dieta control, mientras que a día 55 fue la dieta de aceite de maíz la que presentó unos mayores niveles de retención citoplasmática de NRF2 respecto la dieta control, y con ello, un menor grado de activación del factor de transcripción. A día 52 y día 100 no se apreciaron diferencias significativas entre grupos experimentales (Figura 36 B, C).

Por otra parte, los niveles de NRF2 unido a KEAP1 no correlacionaron con los niveles totales del factor de transcripción, pero sí se obtuvo una correlación negativa estadísticamente significativa con la expresión de GPX4 a 54 días en el grupo de dieta de maíz, y con la expresión de GPX1 a 55 días en el grupo control (Anexo Tabla 4).



**Figura 35. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de NRF2 en hígado de animales sanos.** A. Niveles a lo largo del tiempo. B. Niveles en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Niveles de proteína relativizados a la cantidad de proteína por pocillo. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*, p<0.1 vs. Cs; test de Friedman. □: p< 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados



### 1.2.2. EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN GLÁNDULA MAMARIA.

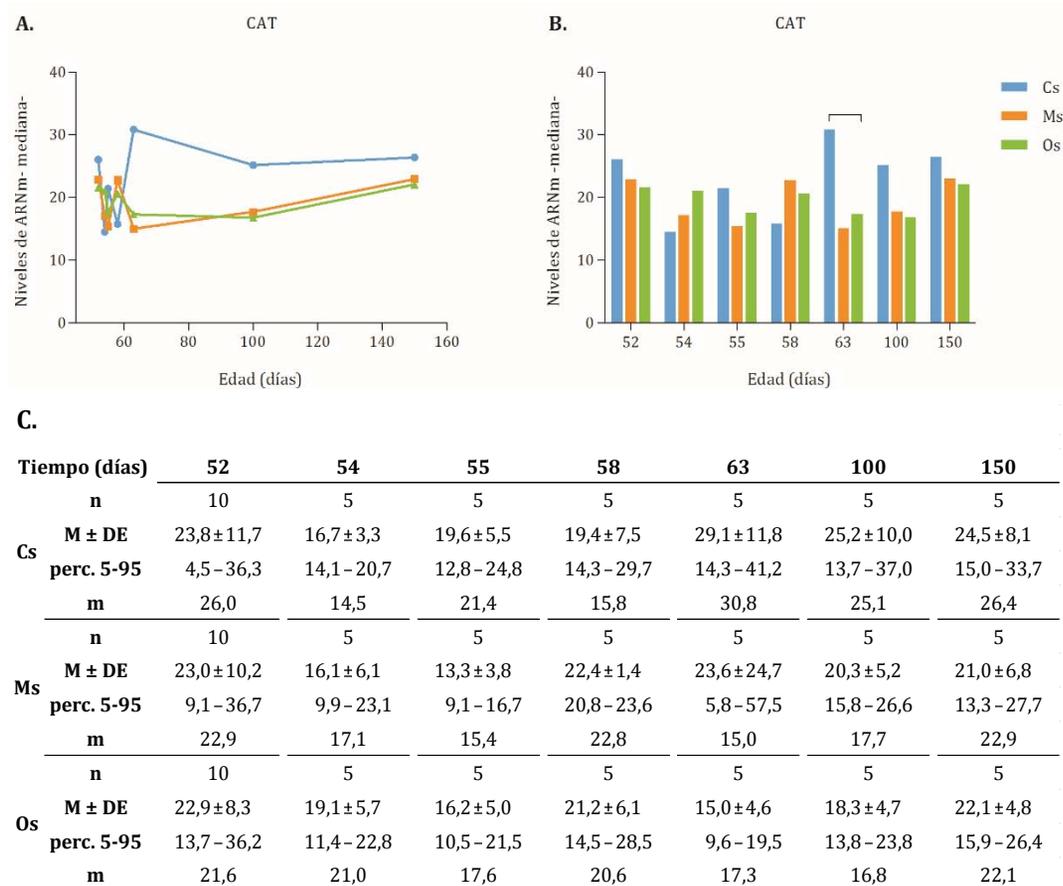
Del mismo modo que en hígado, se determinaron los niveles de expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes y se analizaron los posibles efectos de los lípidos de la dieta a lo largo del tiempo y en cada una de las edades estudiadas. Cabe destacar que, en general, se obtuvieron menos diferencias en tejido mamario que en hígado.

- **Catalasa**

La comparación de la expresión de CAT a lo largo del tiempo entre los diferentes grupos experimentales no mostró diferencias significativas (Figura 37 A, B). En general, las dietas hiperlipídicas tendieron a asociarse a niveles de expresión inferiores a los de la dieta control, excepto a día 54 y 58. A día 63 el grupo de dieta

de aceite de oliva mostró unos niveles significativamente inferiores a los de la dieta control (Figura 37 B, C).

Por otra parte, no se halló correlación entre la expresión de CAT en glándula mamaria y en hígado, excepto a día 150 en el grupo control, donde ambas expresiones correlacionaron negativamente de forma significativa (Anexo Tabla 5).



**Figura 37. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en glándula mamaria de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

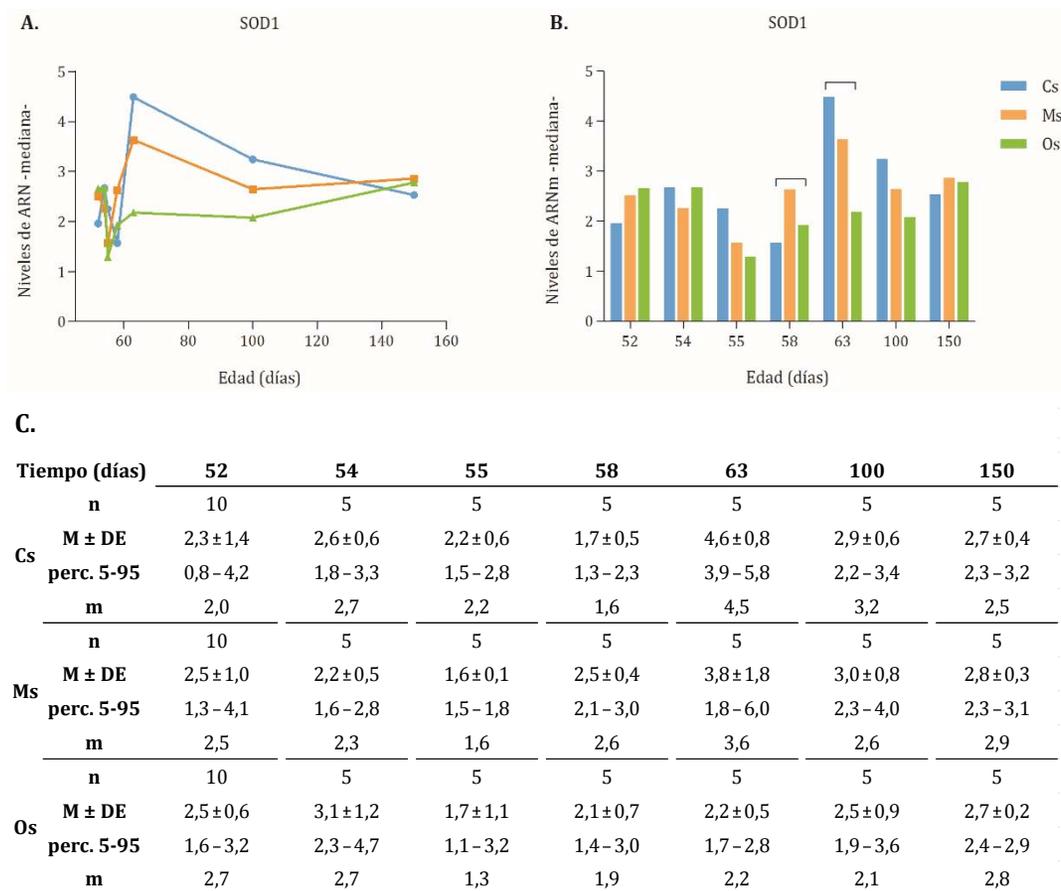
### • Superóxido dismutasa 1

La expresión de SOD1 a lo largo del tiempo no se modificó por efecto de los lípidos de la dieta (Figura 38 A, C). En determinadas edades sí se hallaron algunas

## Resultados

diferencias. Así, a día 58 la dieta de aceite de oliva se asoció a un aumento significativo de expresión de SOD1 respecto a la dieta control. En cambio, a día 63 fue el grupo control el que presentó niveles significativamente superiores a la dieta de aceite de oliva. La menor expresión del grupo de aceite de oliva se mantuvo a día 100 aunque no significativamente (Figura 38 B, C).

Por otra parte, la expresión de SOD1 en glándula mamaria no correlacionó con la expresión en hígado (Anexo Tabla 5).

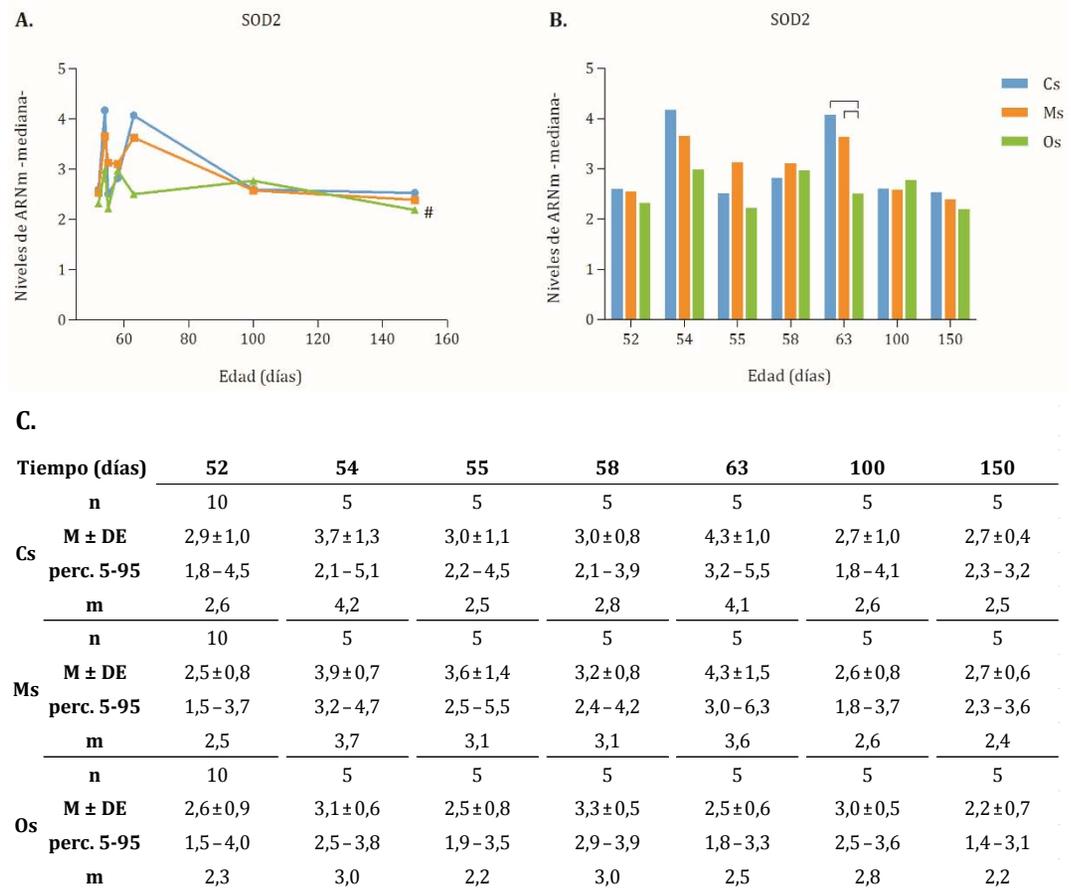


**Figura 38. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en glándula mamaria de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

- **Superóxido dismutasa 2**

Los resultados del análisis a lo largo del tiempo mostraron una tendencia en el grupo de aceite de oliva a presentar unos niveles inferiores a los del grupo de aceite de maíz (Figura 39 A, C). En concreto, a día 63 dicha disminución fue significativa respecto a los otros dos grupos experimentales (Figura 39 B, C).

Por otra parte, los niveles relativos de ARNm de SOD2 en glándula mamaria e hígado no se correlacionaron entre sí (Anexo Tabla 5).



**Figura 39. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en glándula mamaria de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; #:  $p < 0.1$  vs. Ms; test de Friedman.  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

- **Glutación peroxidasa 1**

Los lípidos de la dieta no se asociaron a cambios significativos de la expresión de GPX1 a lo largo del tiempo. Sin embargo, se observó una tendencia del grupo de aceite de maíz a mostrar niveles superiores de expresión respecto a los otros dos tipos de dietas (Figura 40 A, C). Al comparar los resultados a lo largo del tiempo con los obtenidos en hígado, se observó que aunque en los dos tejidos existió una tendencia al aumento de expresión por efecto de las dietas hiperlipídicas, en hígado la dieta de aceite de oliva tendió a presentar niveles superiores que los otros dos tipos de dietas, mientras, en el tejido mamario fue la dieta de aceite de maíz la que mostró unos niveles generalmente superiores a los otros dos tipos de dietas (Figura 29 A y 40 A).

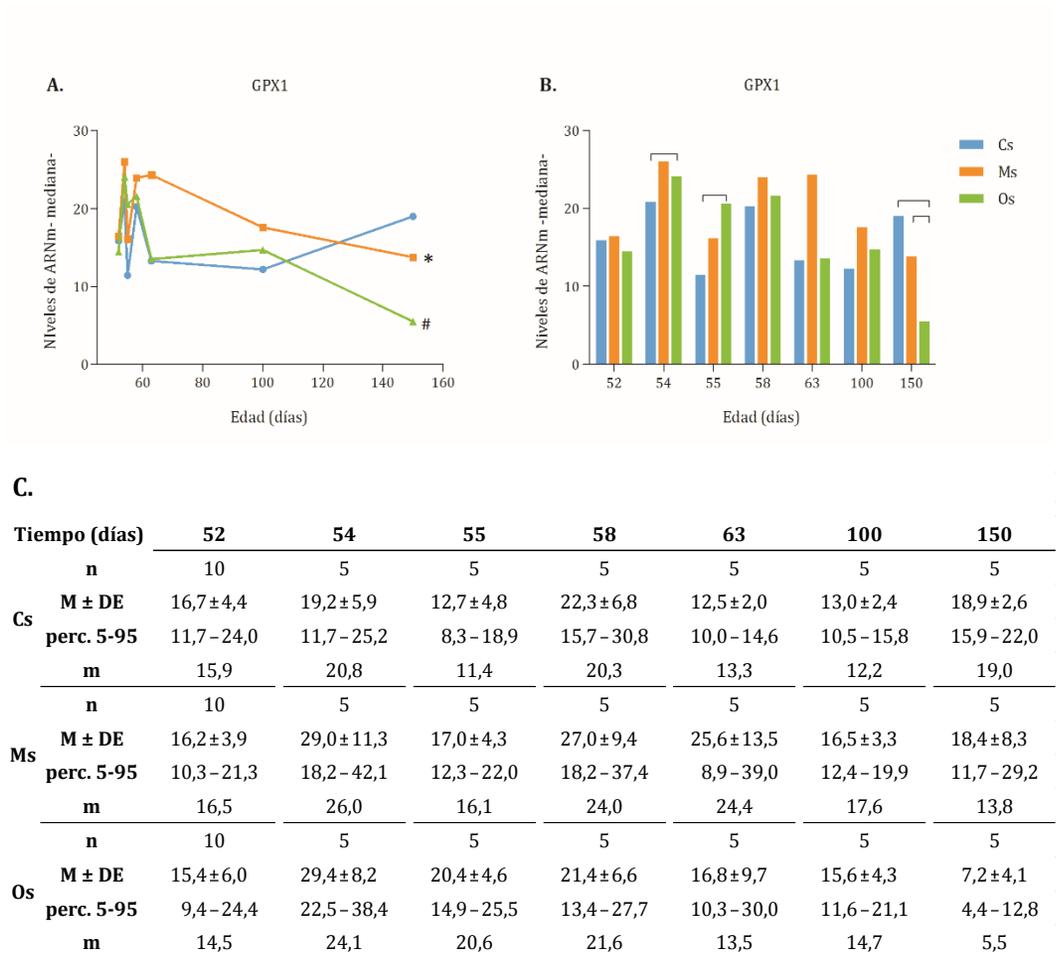
A día 54 y 55, el grupo de la dieta de aceite de oliva presentó mayores niveles de expresión de GPX1 respecto al control. En cambio, a día 58, 63 y 100, fue la dieta de aceite de maíz la que se asoció a niveles superiores de expresión, aunque no de manera significativa, respecto las otras dos dietas. A estas edades, la dieta de aceite de oliva mostró una situación similar a la control. A día 150 el grupo de aceite de oliva disminuyó significativamente la expresión de GPX1 respecto los otros dos grupos (Figura 40 B, C).

Por otra parte, la expresión de GPX1 en glándula mamaria no correlacionó con la hepática (Anexo Tabla 5).

- **Glutación peroxidasa 4**

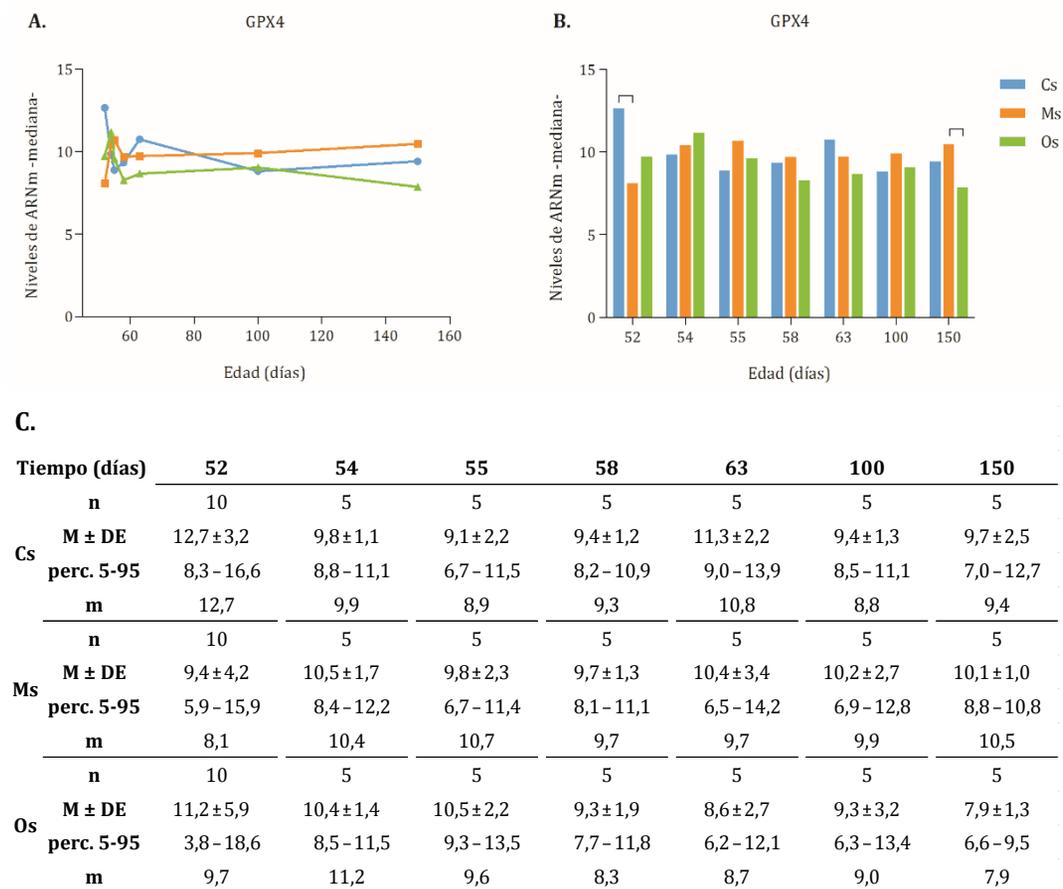
La expresión de GPX4 a lo largo del tiempo no se modificó por efecto de los lípidos de la dieta (Figura 41 A, C). Dicha expresión no se correspondió a la encontrada en hígado (Figura 30 A), donde la dieta de aceite de maíz provocó un aumento de expresión respecto la dieta control. En glándula mamaria, a día 52 la dieta de aceite de maíz se asoció a una disminución significativa de sus niveles de expresión respecto a la dieta control, quedando la dieta de aceite de oliva con valores intermedios. A día 150, en cambio, el grupo de dieta de aceite de maíz presentó mayor expresión respecto a la dieta de aceite de oliva (Figura 41 B, C).

Por otra parte, no se halló correlación entre la expresión de GPX4 en glándula mamaria y la expresión en hígado (Anexo Tabla 5).



**Figura 40. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en glándula mamaria de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano. \*: p< 0.1 vs. Cs; #: p<0.1 vs. Ms. □: p< 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados

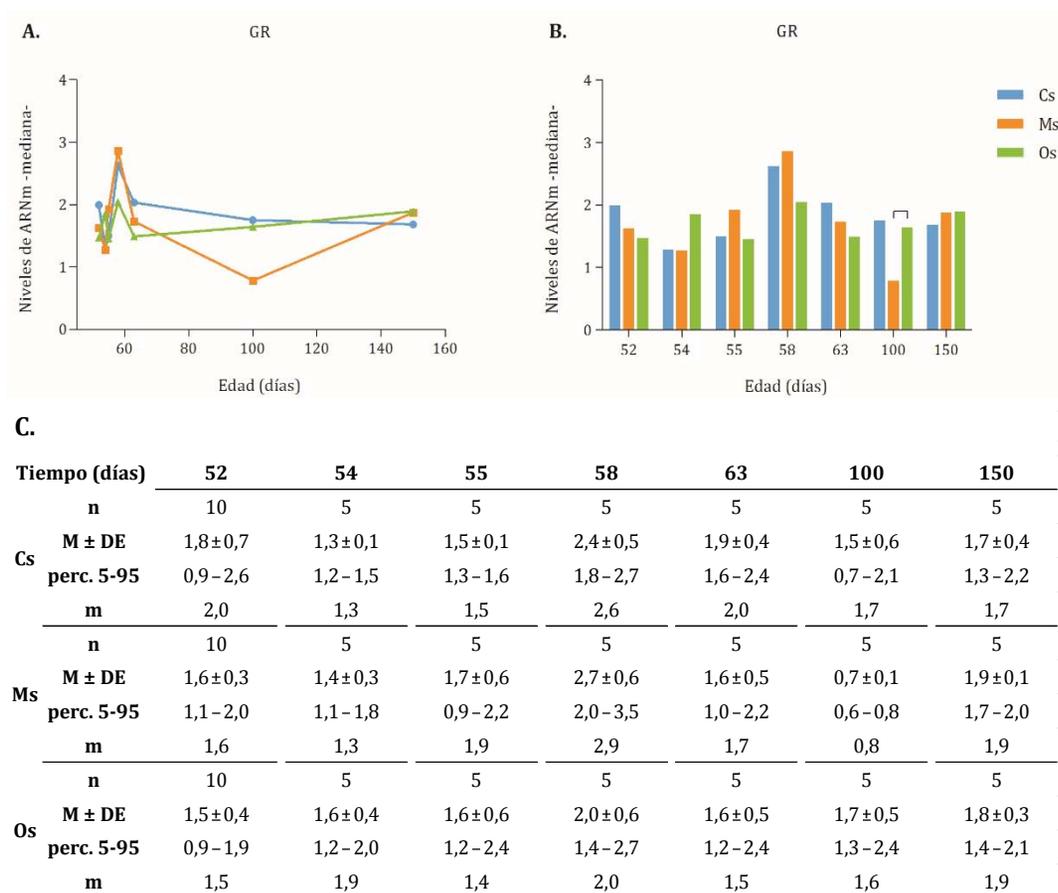


**Figura 41. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en glándula mamaria de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; □: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Glutación reductasa

El análisis de la expresión de GR a lo largo del tiempo tampoco reveló diferencias entre grupos experimentales (Figura 42 A, C), al igual que sucedió en tejido hepático (Figura 31 A). A día 100, la dieta de aceite de maíz se asoció a una disminución de dicha expresión respecto a la dieta de aceite de oliva, la cual presentó valores similares a los del control (Figura 42 B, C).

Por otra parte, los niveles de expresión de GR en glándula mamaria no se correlacionaron con los de hígado, excepto a 100 días en el grupo de aceite de oliva donde se halló una correlación positiva significativa (Anexo Tabla 5).



**Figura 42. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en glándula mamaria de animales sanos.** A. Expresión a lo largo del tiempo. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 1.2.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA. NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN.

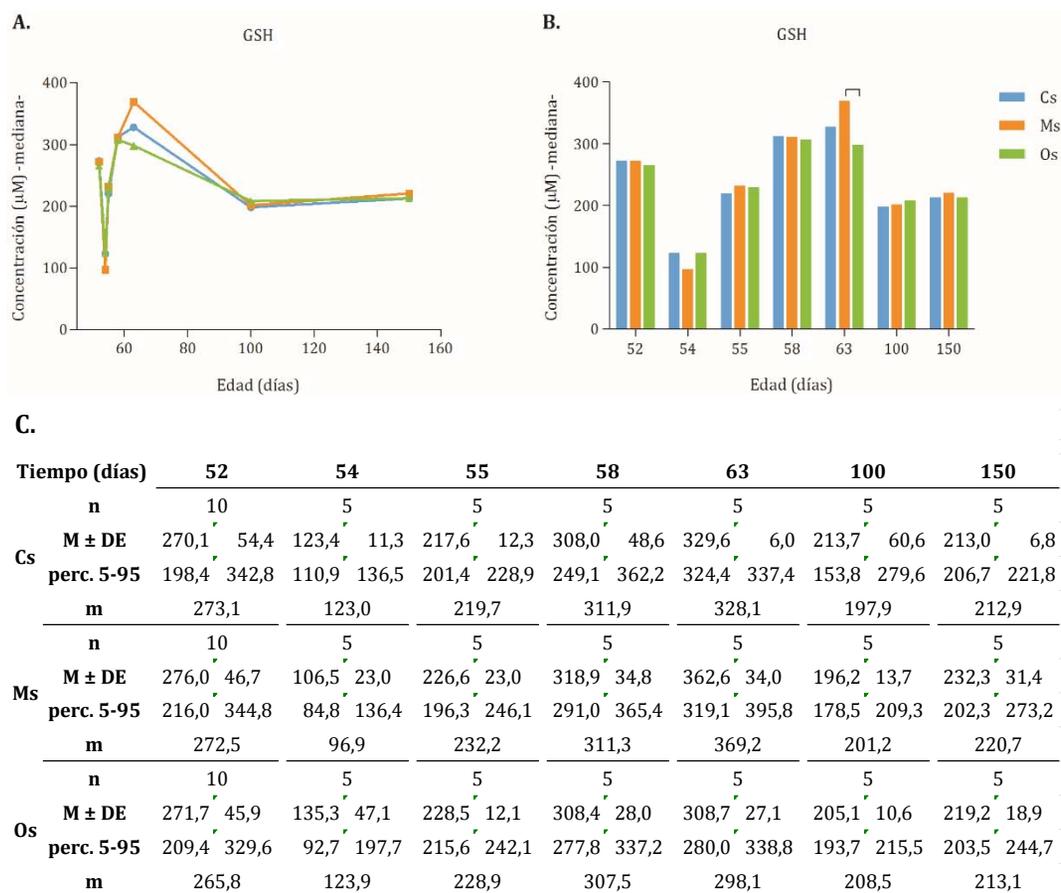
El estudio de la defensa antioxidante no enzimática consistió en la determinación de los niveles plasmáticos de glutatión en sus formas oxidada (GSSG) y reducida (GSH), así como sus niveles totales (GSH + GSSG) y las ratios GSH/GSH total y GSH/GSSG.

## Resultados

### 1.2.3.1. GSH

No se observaron cambios en los niveles de GSH a lo largo del tiempo entre los distintos grupos experimentales (Figura 43 A, C). En el análisis de cada una de las edades estudiadas, a día 63 el grupo de aceite de maíz presentó valores significativamente superiores al grupo de aceite de oliva (Figura 43 B, C). En el resto de las edades, los lípidos de la dieta no modificaron los niveles de GSH de manera significativa.

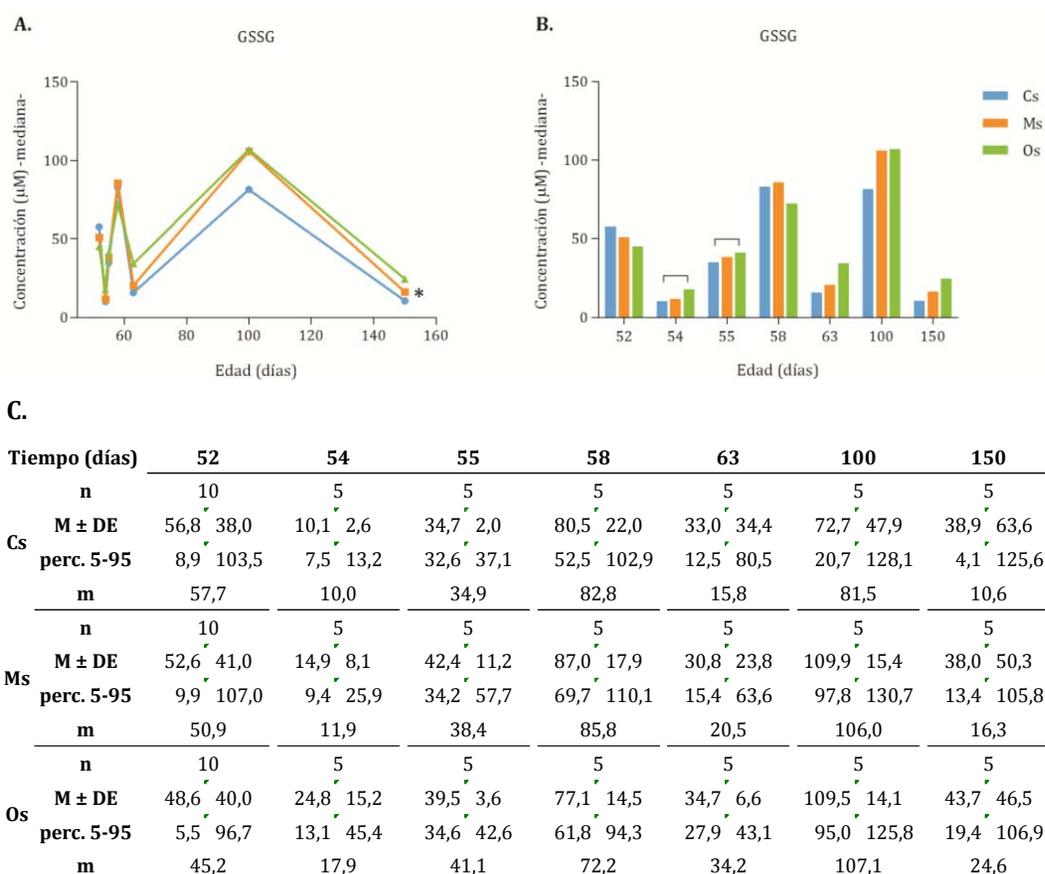
Por otra parte los niveles plasmáticos de GSH no correlacionaron con los de la actividad de GPX (Anexo Tabla 6).



**Figura 43. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH (µM) en plasma de animales sanos.** A. Concentración a lo largo del tiempo. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; —: p < 0,05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 1.2.3.2. GSSG

Los niveles de GSSG a lo largo del tiempo tampoco fueron distintos por efecto del tipo de dieta, aunque existió una tendencia en el grupo de aceite de maíz a presentar unos niveles superiores respecto a la dieta control (Figura 44 A, C). En dos edades concretas, a 54 y 55 días de edad, el grupo de la dieta de aceite de oliva mostró unos niveles significativamente superiores a los del grupo control. Este patrón se repitió a día 63, 100 y 150, aunque no de manera significativa. A día 100 se alcanzaron los niveles máximos de GSSG, de manera que las dietas hiperlipídicas duplicaron sus niveles respecto a 52 días. En cambio, 50 días más tarde, a 150 días de edad, los niveles de GSSG fueron hasta 4 veces menores que los de día 100 (Figura 44 B, C).



**Figura 44. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSSG (µM) en plasma de animales sanos.** A. Concentración a lo largo del tiempo. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*:  $p < 0.1$  vs. Cs; test de Friedman.  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

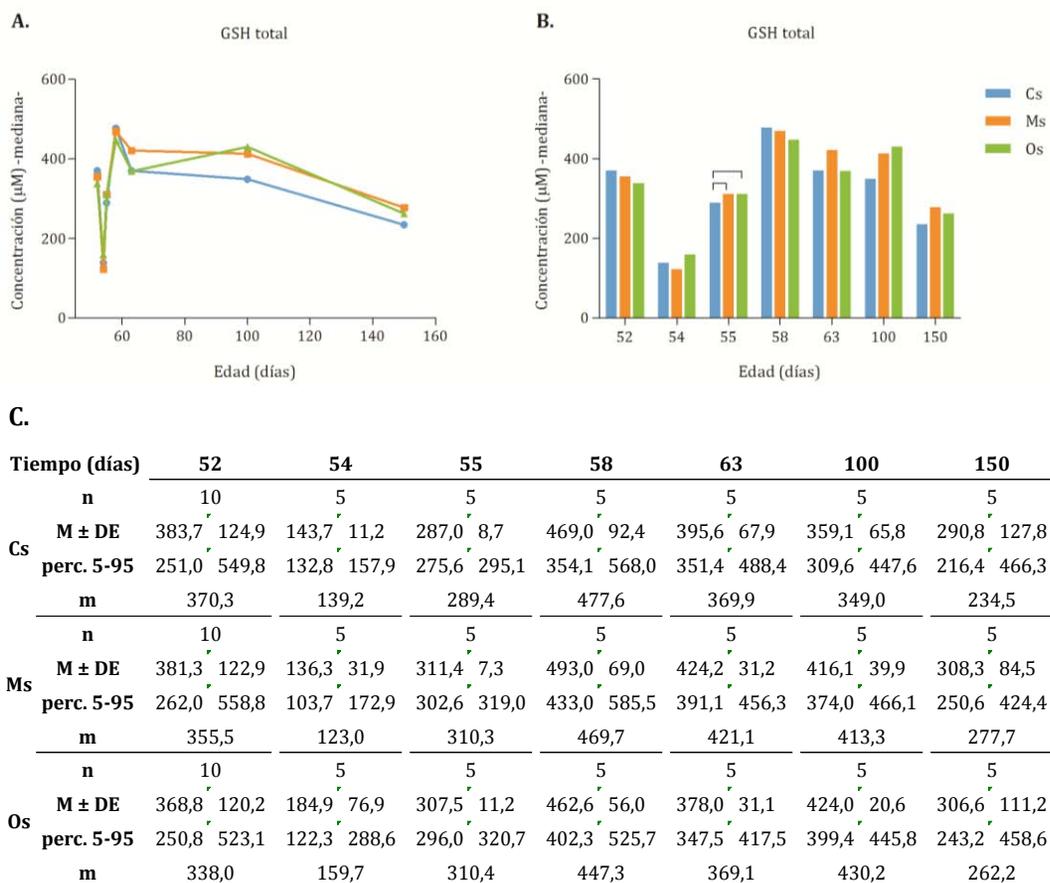
## *Resultados*

Al correlacionar los niveles de GSSG con los de GSH se obtuvo una correlación positiva estadísticamente significativa en todos los grupos a 52 y 58 días. Por otra parte, los niveles de GSSG no correlacionaron con los de la actividad GPX (Anexo Tabla 6 y 7).

### **1.2.3.3. GSH total**

Los niveles de GSH total a lo largo del tiempo no difirieron entre grupos experimentales (Figura 45 A, C). A día 55, ambas dietas hiperlipídicas se asociaron a niveles significativamente superiores de GSH total respecto a la dieta control (Figura 45 B, C). Este patrón se repitió a 100 y 150 días, aunque no de manera estadísticamente significativa. En el resto de las edades no se observaron diferencias significativas entre grupos.

Por otra parte, se obtuvieron correlaciones positivas entre los niveles de GSH total y los de GSH en todos los grupos experimentales a todas las edades, aunque no todas ellas fueron significativas. Así, se obtuvo significación estadística a 52, 54 y 58 días en todos los grupos experimentales, y en el resto de edades en determinados grupos independientes (a 55 días en el grupo control y a 63, 100 y 150 días en el grupo de aceite de oliva) (Anexo Tabla 6).

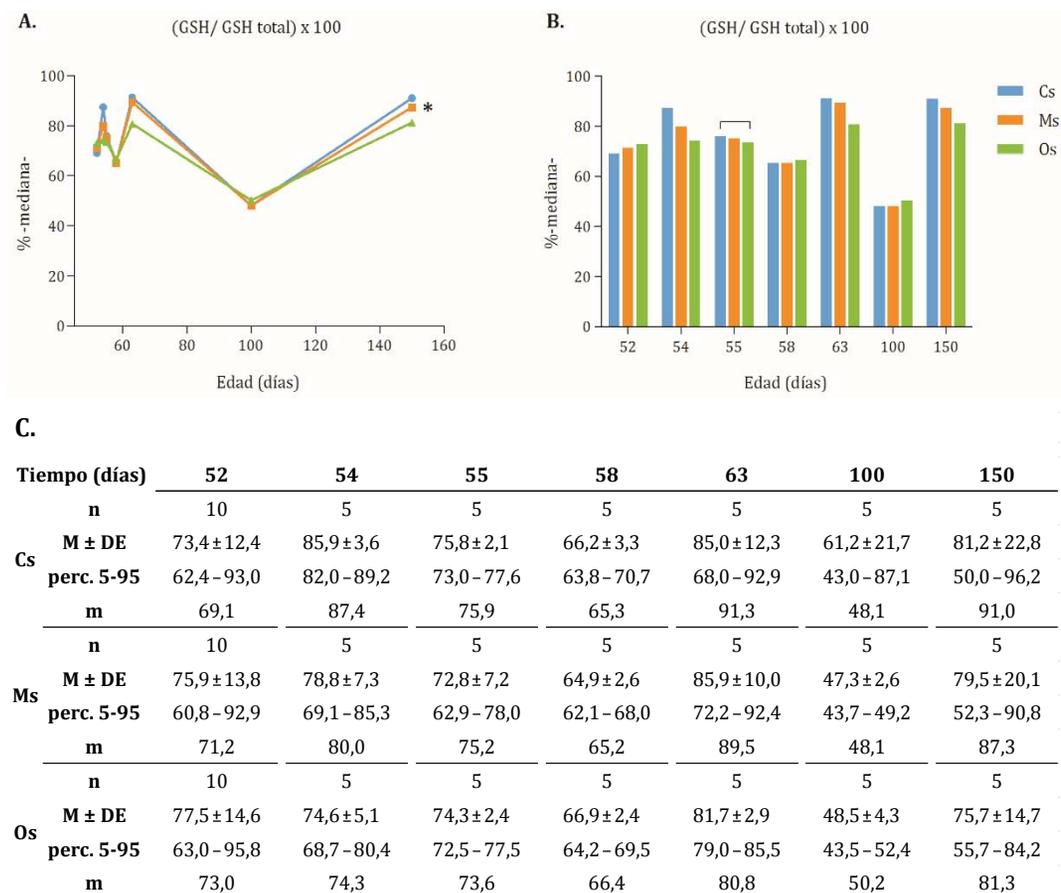


**Figura 45. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH total ( $\mu\text{M}$ ) en plasma de animales sanos.** A. Concentración a lo largo del tiempo. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $\text{---}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

#### 1.2.3.4. Ratio GSH/GSH total

El cociente GSH/GSH total a lo largo del tiempo no se modificó por efecto de los lípidos de la dieta, aunque el grupo de la dieta de aceite de maíz tendió a presentar unos valores inferiores a los del control (Figura 46 A, C). A día 55, la dieta de aceite de oliva se asoció a valores significativamente inferiores a los de la dieta control (Figura 46 B, C). A pesar de la falta de significación estadística, a día 54, 63 y 150, las dietas hiperlipídicas mostraron unos ratios inferiores a las del control.

## Resultados

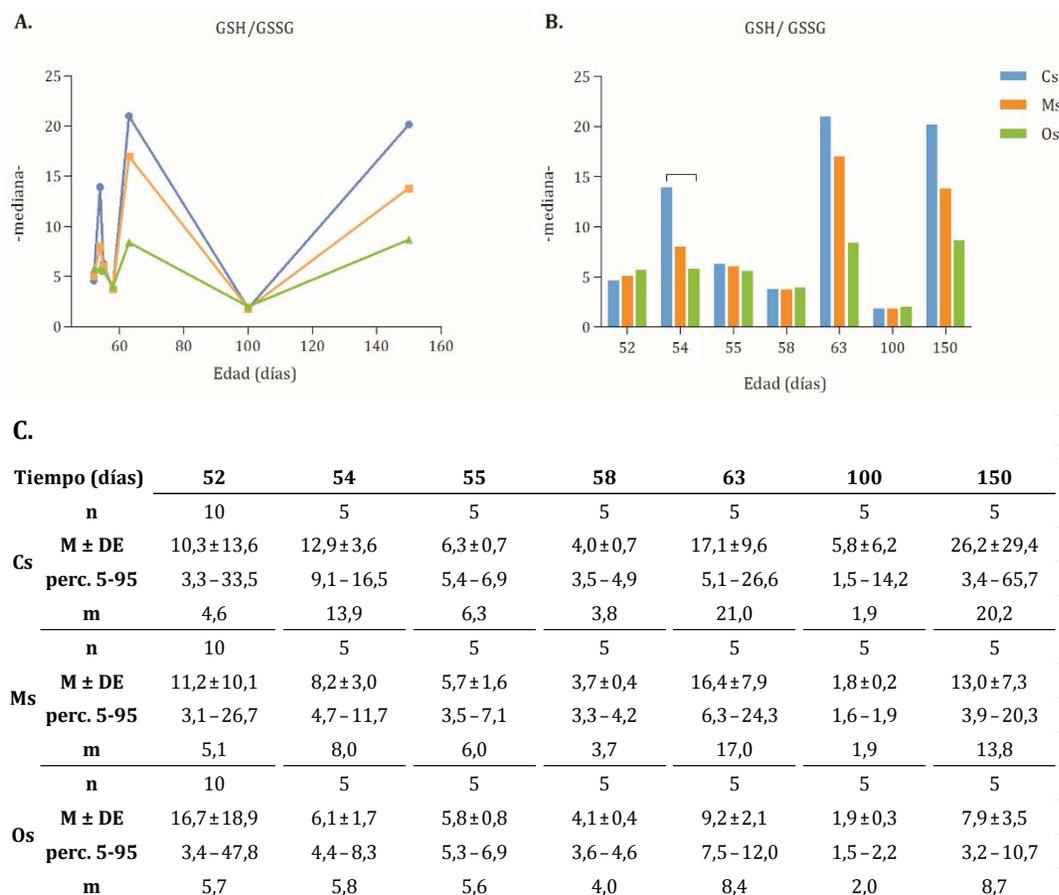


**Figura 46. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/GSH total (%) de animales sanos.** A. Ratio a lo largo del tiempo. B. Ratio en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*:  $p < 0,1$ ; test de Friedman.  $\square$ :  $p < 0,05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 1.2.3.5. Ratio GSH/GSSG

Finalmente, el cociente GSH/GSSG a lo largo del tiempo tampoco varió de forma estadísticamente significativa en función de la dieta (Figura 47 A, C). Aún y así, generalmente, las dietas hiperlipídicas se asociaron a valores inferiores a los de la dieta control. A 54 días, las diferencias entre el grupo de aceite de oliva y el control fueron significativas, de manera que éste duplicó sus niveles respecto al primero. A día 63 y 150, se repitió la misma tendencia pero sin significación estadística (Figura 47 B, C). En el resto de las edades las tres dietas mostraron valores muy similares.

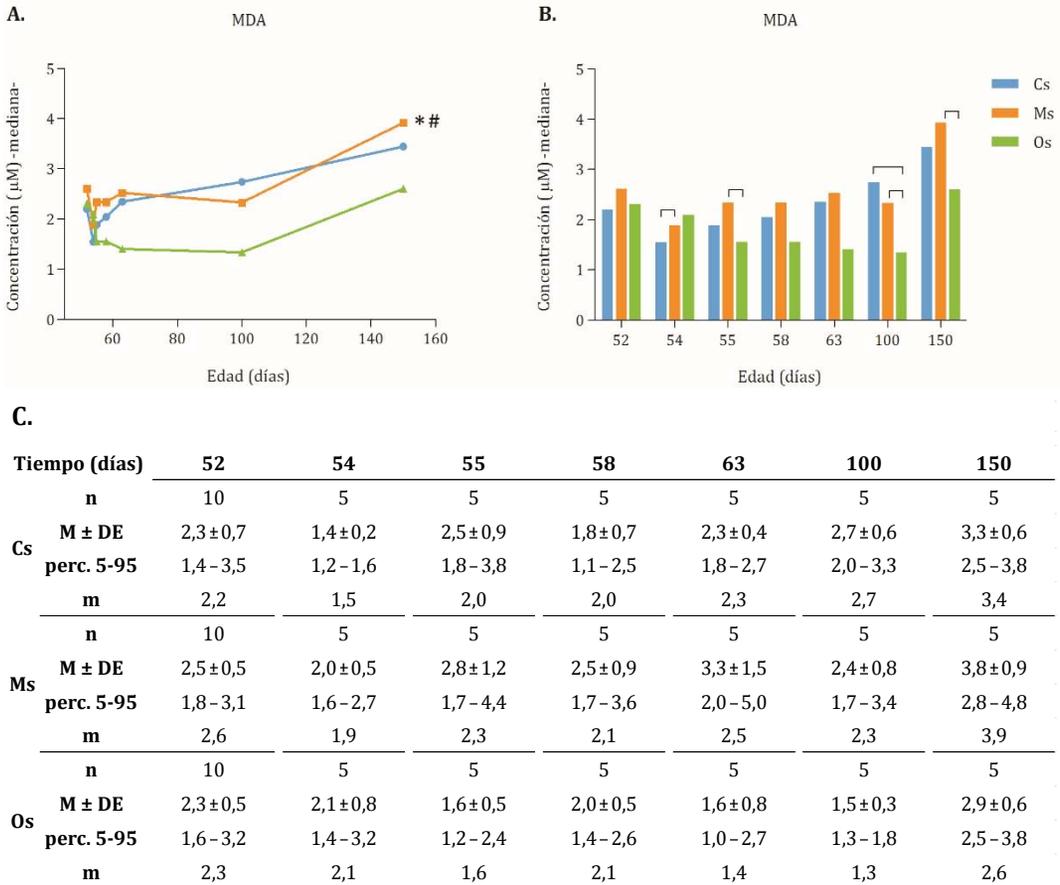
La ratio GSH/GSSG correlacionó negativamente de manera significativa con los niveles de GSSG en todas las edades en todos los grupos experimentales, excepto en el grupo de aceite de maíz a 100 días. Además, también correlacionó negativamente con los niveles de GSH total a 52 días en todos los grupos experimentales. A 58, 100 y 150 días dicha correlación sólo fue significativa en los grupos control y de aceite de oliva, y a 63 días sólo en el control (Anexo Tabla 6).



**Figura 47. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/GSSG en plasma de animales sanos.** A. Ratio a lo largo del tiempo. B. Ratio en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 1.2.4. DAÑO OXIDATIVO EN LÍPIDOS. NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA

El daño oxidativo sobre los lípidos se analizó mediante la determinación de los niveles plasmáticos de MDA. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre dichos niveles a lo largo del tiempo entre los grupos experimentales, aunque sí se obtuvo una tendencia en el grupo de dieta de aceite de maíz a presentar valores superiores al resto (Figura 48 A, C).



**Figura 48. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de MDA (µM) en plasma de animales sanos.** A. Concentración a lo largo del tiempo. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Cs: grupo control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano; \*: p < 0.1 vs. Cs; #: p < 0.1 vs. Ms; -∩-: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

El análisis de cada una de las edades reveló que la dieta de aceite de maíz se asoció a niveles de MDA superiores a los otros dos tipos de dieta excepto a 54 días donde los niveles fueron superiores sólo respecto al control, y a 100 días, donde el

grupo de aceite de maíz presentó valores mayores que el grupo de aceite de oliva pero menores que el control. La dieta de aceite de oliva, en cambio, se asoció a menores niveles de MDA que los otros dos tipos de dietas, excepto a 52 y 54 días donde fueron similares a los del control. Desde día 55, dicha dieta se asoció a valores inferiores a los de la dieta control (Figura 48 B, C).

## **2. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA**

Con el objetivo de estudiar la influencia de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en la iniciación de la carcinogénesis mamaria, se determinaron diferentes parámetros de estrés en las horas posteriores a la inducción con el carcinógeno. Concretamente a 12, 24 y 48 horas post-inducción, equivalentes, respectivamente, a 53.5, 54 y 55 días de edad de los animales. Además, se tuvieron en cuenta los niveles de los diferentes parámetros 12 horas antes de la administración del carcinógeno (estado basal), con el fin de dilucidar de una manera más clara los posibles efectos de éste. Las comparaciones entre dichos tiempos para cada uno de los grupos experimentales se realizaron mediante el test de U de Mann Whitney (Tabla 10), dado que al tratarse únicamente de 4 puntos no pudo realizarse el análisis de curvas de Friedman

Así, se analizaron los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR) en hígado y en glándula mamaria, y los niveles de actividad hepática de SOD total, CAT y GPX total. Para profundizar en la regulación de la expresión hepática de dichas enzimas, se determinaron los niveles proteicos totales del factor de transcripción NRF2, así como los niveles de su retención citoplasmática. Además, se analizó la defensa antioxidante no enzimática, mediante la determinación de los parámetros de glutatión en plasma así como la expresión de la enzima GSS y la actividad GR en determinadas edades, con el fin de valorar su posible influencia sobre los niveles de glutatión. Además, se analizaron diferentes parámetros de daño sobre las macromoléculas, como la peroxidación lipídica en

## Resultados

plasma, mediante la determinación de los niveles de MDA; el daño oxidativo y daño total sobre el ADN en glándula mamaria, mediante la determinación de los niveles de 8-OHdG y el ensayo Comet respectivamente; y los niveles de proteínas oxidadas en plasma.

### 2.1. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA

Para evaluar la respuesta antioxidante enzimática de los animales de los diferentes grupos tras la administración del carcinógeno se analizaron los niveles de ARNm relativo de las principales enzimas antioxidantes, tanto en hígado como en glándula mamaria, así como la actividad hepática. Además se determinaron los niveles relativos de NRF2 y su retención citoplasmática hepática.

#### 2.1.1. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO

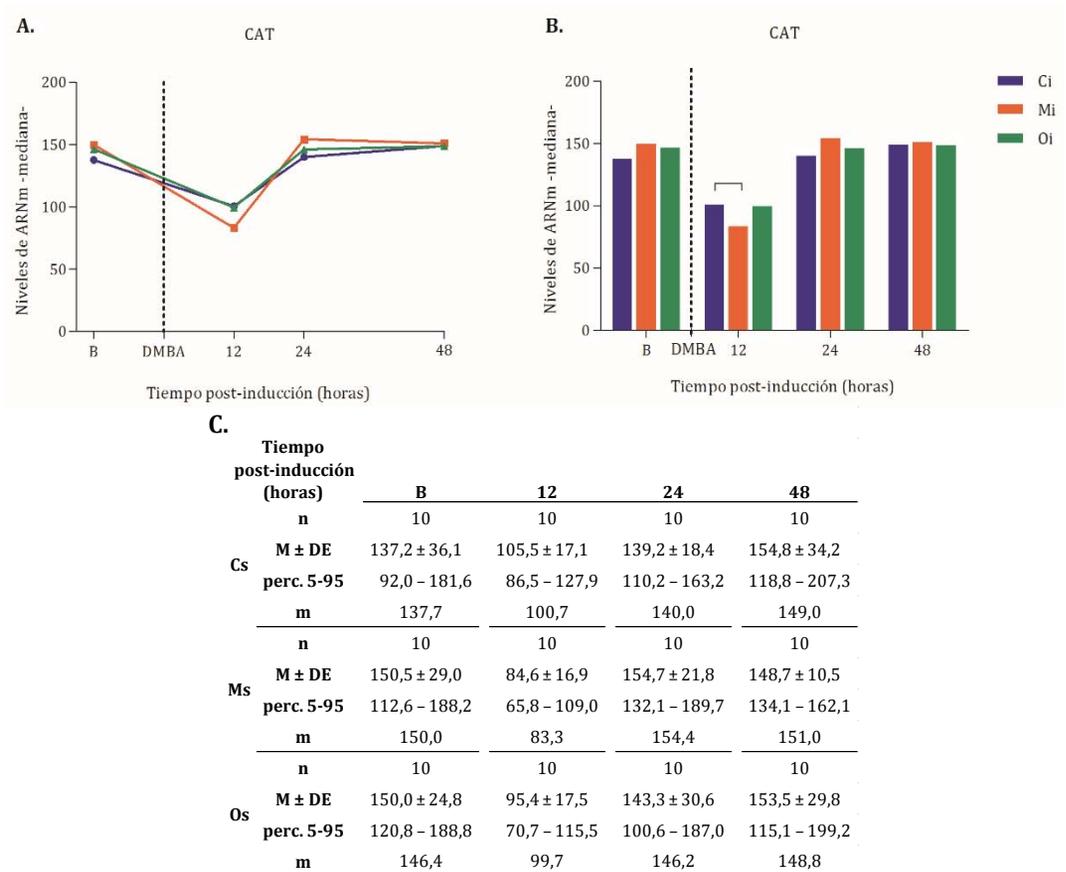
El estudio en el tejido hepático permitió evaluar los efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en el principal órgano metabolizador del carcinógeno, antes y después de su administración. De esta manera, se analizó la diferente respuesta de los animales al carcinógeno según el tipo de dieta administrada.

##### 2.1.1.1. Expresión génica

- **Catalasa**

Doce horas después de la administración del carcinógeno la expresión de CAT fue menor en todos los grupos experimentales respecto a la situación basal (previa a dicha administración). Tras esta disminución se produjo un aumento en todos ellos (24h vs. 12h) hasta retornar a niveles similares a los basales (Figura 49 A, C y Tabla 10).

Al comparar la expresión entre los distintos grupos, los resultados mostraron que 12 horas después de la inducción con el carcinógeno, la dieta de aceite de maíz se asoció a unos niveles inferiores de expresión de CAT respecto a la dieta control, mientras que la dieta de aceite de oliva mantuvo unos niveles similares (Figura 49 B, C). En el resto de las edades no se observaron diferencias debidas al tipo de dieta.



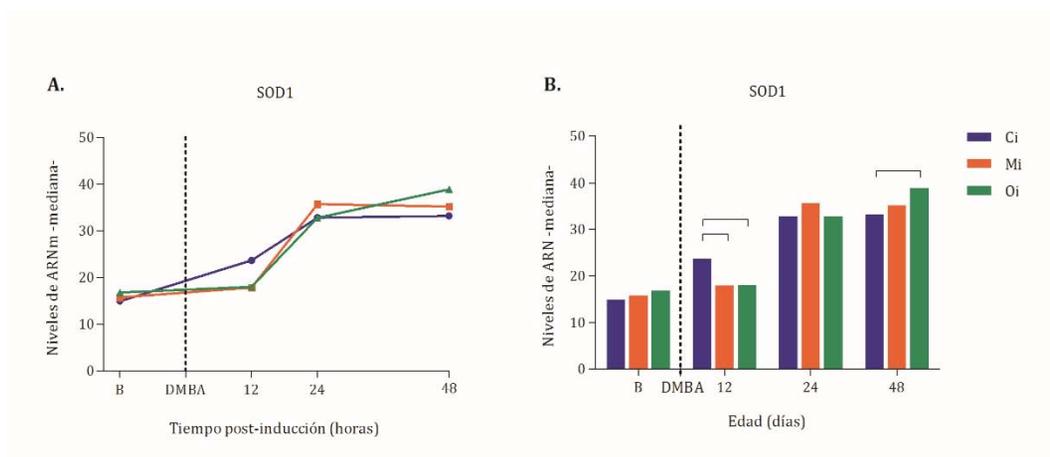
**Figura 49. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Superóxido dismutasa 1

En todos los grupos experimentales se observó un aumento de la expresión de SOD1 tras la administración del carcinógeno (Figura 50 A, C y Tabla 10).

Al analizar las diferencias entre grupos experimentales, a las 12 horas post-inducción las dietas hiperlipídicas se asociaron a unos menores niveles de expresión respecto a la dieta control. Este efecto no se mantuvo en las horas posteriores, de manera que a las 48 horas el grupo de dieta de aceite de oliva mostró una mayor expresión respecto a la dieta control (Figura 50 B, C).

## Resultados



### C.

		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	15,7 ± 4,1	23,2 ± 4,3	33,5 ± 6,0	32,6 ± 5,4
	perc. 5-95	11,4 - 21,9	17,6 - 29,4	25,3 - 41,7	24,7 - 39,8
	m	15,0	23,6	32,8	33,2
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	16,3 ± 6,2	17,9 ± 3,0	37,5 ± 7,0	35,9 ± 3,7
	perc. 5-95	9,4 - 25,7	14,5 - 22,4	30,0 - 48,8	31,7 - 42,1
	m	15,7	17,8	35,7	35,2
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	19,6 ± 7,6	18,3 ± 3,2	33,9 ± 4,7	38,6 ± 5,0
	perc. 5-95	12,0 - 31,7	14,6 - 22,7	28,6 - 40,5	31,4 - 44,8
	m	16,8	18,0	32,8	38,9

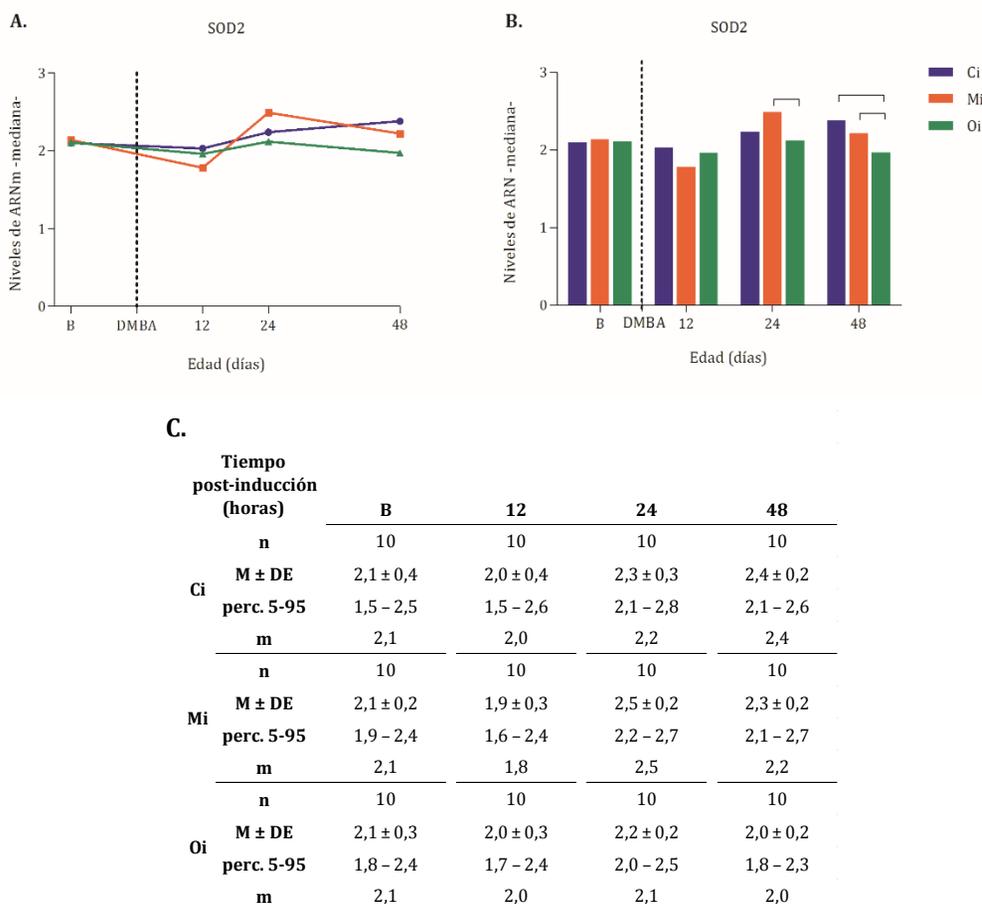
**Figura 50. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Superóxido dismutasa 2

El grupo que más modificó sus niveles de expresión de SOD2 tras la administración del carcinógeno fue el grupo de aceite de maíz. En general, la expresión hepática de SOD2 aumentó en todos los grupos experimentales 24 horas después de la inducción respecto a la situación basal. Este aumento estuvo seguido de una disminución en el grupo de aceite de maíz y de una estabilización de los niveles en el resto de grupos (Figura 51 A, C Tabla 10).

El análisis en cada una de las edades estudiadas mostró que a 24 y 48 horas tras la inducción, el grupo de dieta de aceite de maíz presentaba unos niveles de expresión superiores a los del grupo de aceite de oliva. Dicho grupo mostró unos niveles inferiores incluso al control a las 48 horas (Figura 51 B, C).

Por otra parte, cabe destacar que la expresión de SOD1 se correlacionó positivamente con la de SOD2 en el grupo control a las 12 y 48 horas después de la administración del carcinógeno. En el grupo de aceite de maíz dicha correlación positiva se observó a las 12 horas (Anexo Tabla 9).

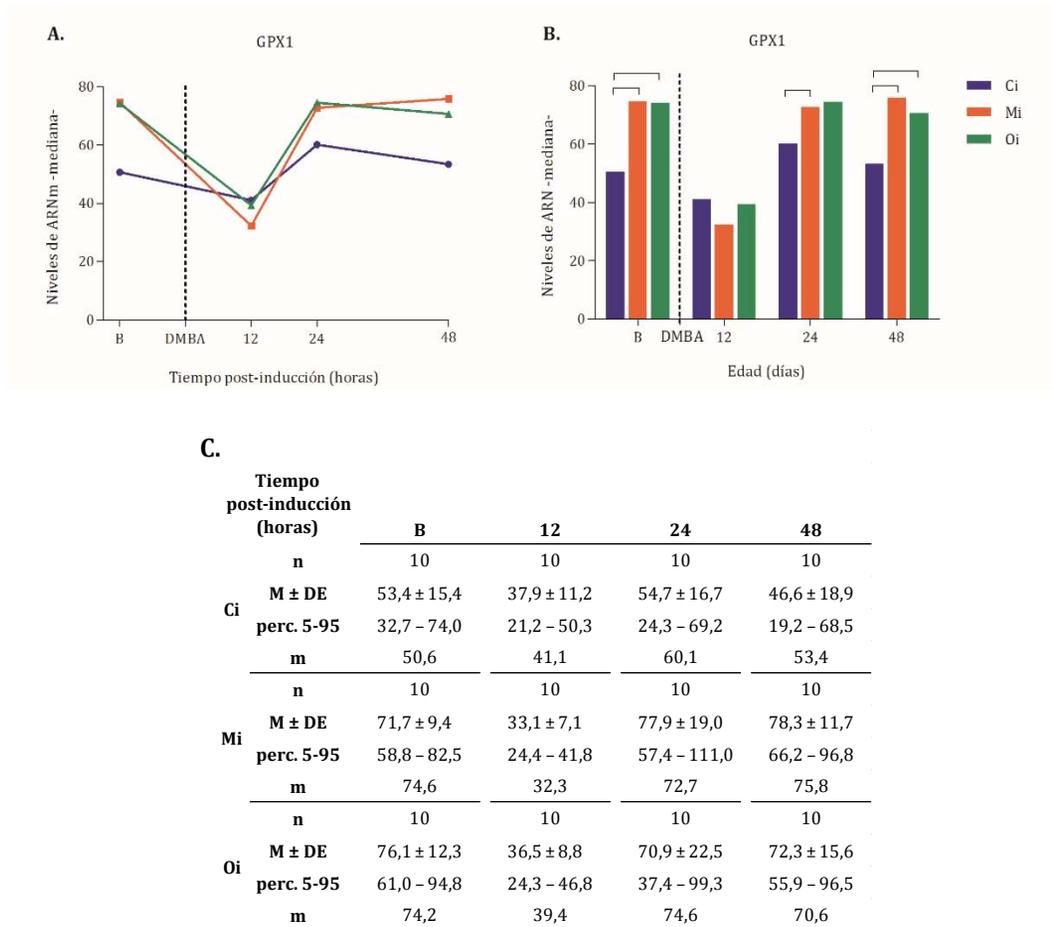


**Figura 51. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; —:  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados

### • Glutatión peroxidasa 1

La expresión de GPX1 disminuyó en todos los grupos experimentales a las 12 horas de la inducción con el carcinógeno. Dicha disminución fue mayor en los dos grupos de dietas hiperlipídicas dado que presentaban valores basales superiores a los del control. Sin embargo, 12 horas después de esta disminución, todos los grupos experimentales recuperaron sus niveles respecto a los basales, observándose un aumento de la expresión de todos los grupos 24 horas después de la administración del DMBA (Figura 52 A, C y Tabla 10).



**Figura 52. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

En todas las edades estudiadas, excepto a las 12 horas post-inducción, los grupos de dietas hiperlipídicas presentaron unos mayores niveles de expresión de GPX1 respecto a la dieta control (Figura 52 B, C).

- **Glutación peroxidasa 4**

Tras la administración del carcinógeno (12 horas) la expresión de GPX4 disminuyó en los dos grupos de dietas hiperlipídicas. Sin embargo, a las 24 horas aumentó en todos los grupos experimentales mostrando los niveles máximos de expresión. Tras este aumento se produjo una disminución significativa en el grupo control y de aceite de maíz, hasta valores similares a los basales, excepto en este último grupo que continuó con unos niveles aumentados (Figura 53 A, C y Tabla 10).

En general el grupo de aceite de maíz mostró unos niveles superiores de expresión de GPX4, respecto a la dieta control antes de la administración del carcinógeno, y también respecto al grupo de aceite de oliva a las 24 horas post-inducción. A las 48 horas las diferencias no fueron significativas. A las 12 horas sin embargo los grupos de dietas hiperlipídicas presentaron unos niveles inferiores a los del control. El grupo de aceite de oliva mostró, generalmente, unos niveles inferiores al grupo de dieta de aceite de maíz y más similares a los del grupo control (Figura 53 B, C).

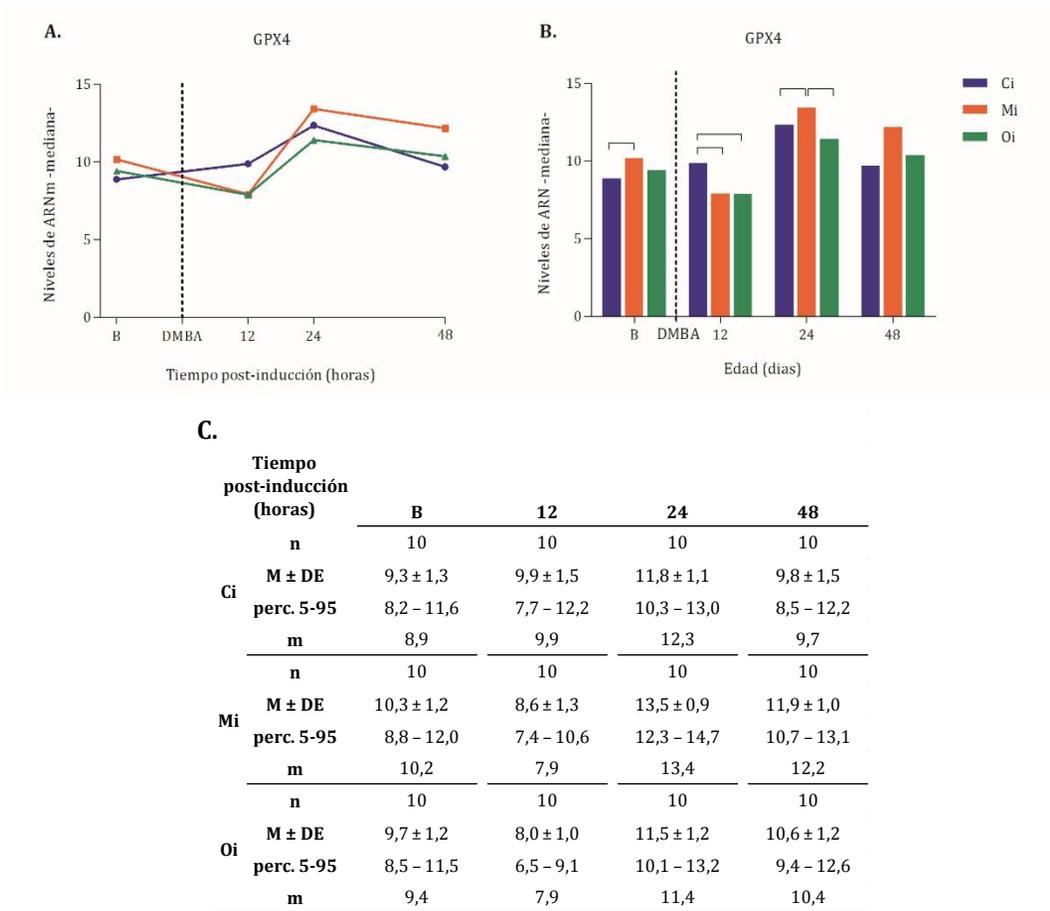
Por otro lado, los niveles de expresión de GPX1 y de GPX4 no se correlacionaron entre sí en ningún grupo experimental en ninguna de las edades estudiadas (Anexo Tabla 10).

- **Glutación reductasa**

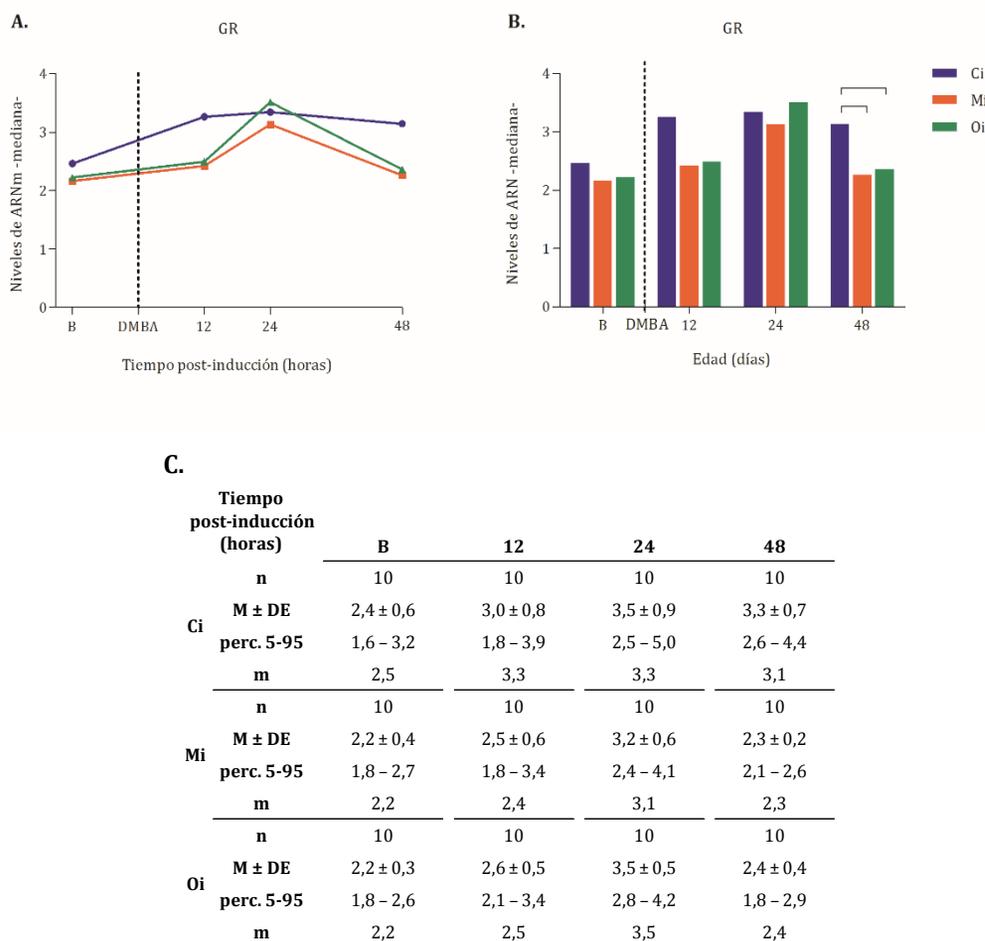
Los niveles de expresión de GR aumentaron en todos los grupos experimentales a las a las 12 y 24 horas post-inducción. Tras este aumento, las dietas hiperlipídicas se asociaron a una disminución de los niveles de GR, hasta niveles basales, mientras que el grupo control mantuvo unos niveles elevados (Figura 54 A, C y Tabla 10).

El análisis de las diferencias entre los grupos experimentales en cada una de las edades estudiadas mostró una tendencia por parte de los grupos de dietas hiperlipídicas a presentar una menor expresión de GR respecto al control, aunque sólo de manera significativa a las 48 horas post-inducción (Figura 54 B, C).

## Resultados



**Figura 53. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{\text{---}}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.



**Figura 54. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

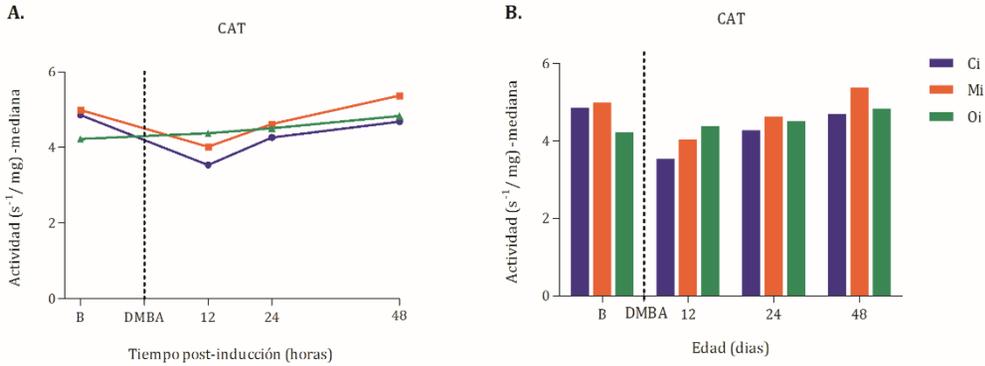
### 2.1.1.2. Actividad enzimática

Del mismo modo que en los animales sanos, se determinó la actividad CAT, SOD total y GPX total en hígado de los animales inducidos con el carcinógeno.

Resultados

• **Catalasa**

La actividad hepática CAT disminuyó en los grupos control y de aceite de maíz a las 12 horas de la administración del carcinógeno. Sin embargo, 48 horas después, todos los grupos experimentales mostraron unos niveles similares a los correspondientes basales (Figura 55 A, C y Tabla 10).



**C.**

		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	4,9 ± 0,7	3,6 ± 1,4	4,2 ± 0,7	4,7 ± 1,7
	perc. 5-95	4,0 - 5,8	1,5 - 5,2	3,1 - 5,2	2,2 - 6,8
	m	4,9	3,5	4,3	4,7
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	5,0 ± 1,1	3,8 ± 1,5	4,7 ± 0,5	4,9 ± 1,4
	perc. 5-95	3,3 - 6,3	1,4 - 5,8	4,2 - 5,3	2,5 - 6,3
	m	5,0	4,0	4,6	5,4
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	4,1 ± 1,0	4,3 ± 0,7	4,3 ± 0,9	4,9 ± 0,7
	perc. 5-95	2,5 - 5,1	3,2 - 5,0	3,0 - 5,3	4,1 - 6,1
	m	4,2	4,4	4,5	4,8

**Figura 55. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de CAT tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; s<sup>-1</sup>/mg: unidades de actividad enzimática. □: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

En ninguna de las edades estudiadas de la iniciación se hallaron diferencias en la actividad CAT entre grupos experimentales (Figura 55 B, C).

Por otra parte, no se halló ninguna correlación entre los niveles de expresión y los de actividad de esta enzima (Anexo Tabla 8).

- **Superóxido dismutasa**

La actividad hepática de SOD no se modificó tras la administración del carcinógeno en los grupos control y de aceite de maíz. En cambio, el grupo de aceite de oliva mostró una disminución de sus niveles de actividad a las 24 horas, seguida de un aumento a las 48 horas, alcanzando valores similares a los basales (Figura 56 A, C y Tabla 10).

Además, no se observaron diferencias en la actividad de la enzima SOD entre grupos experimentales excepto a las 24 horas, donde la dieta de aceite de oliva se asoció a unos niveles inferiores de actividad respecto a los otros dos grupos (Figura 56 B, C).

Por otra parte, al correlacionar los niveles de expresión de SOD1 y SOD2 con los niveles de actividad SOD, se obtuvo una correlación negativa entre la expresión de SOD2 y la actividad SOD a las 48 horas post-inducción (Anexo Tabla 9).

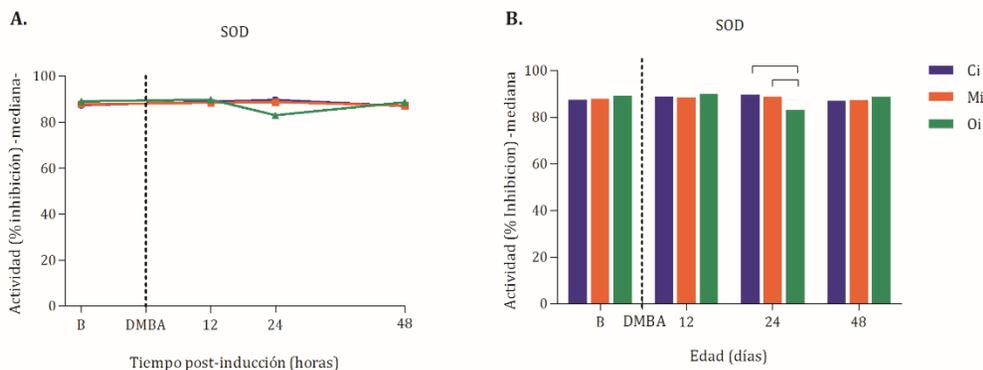
- **Glutación peroxidasa**

En los grupos de dietas hiperlipídicas no se observaron cambios significativos en la actividad hepática de GPX, de manera que sus niveles 48 horas post-inducción fueron similares a los basales. En cambio, el grupo control presentó una disminución de dicha actividad, quedando por debajo de los niveles basales (Figura 57 A, C y Tabla 10).

En cuanto al análisis de las diferencias entre los grupos experimentales en cada una de las edades, los grupos de dietas hiperlipídicas se asociaron a unos niveles superiores de actividad GPX respecto al grupo control en estado basal y a 24 y 48 horas post-inducción, aunque en esta última edad sólo se observó significación estadística en el grupo de aceite de maíz (Figura 57 B, C). Esta tendencia fue similar a la encontrada en los niveles de expresión de GPX1 (Figura 52) y GPX4 (Figura 53), Cabe destacar que la mayor actividad GPX en los grupos de dietas hiperlipídicas también se observó en los animales sanos (Figura 34).

## Resultados

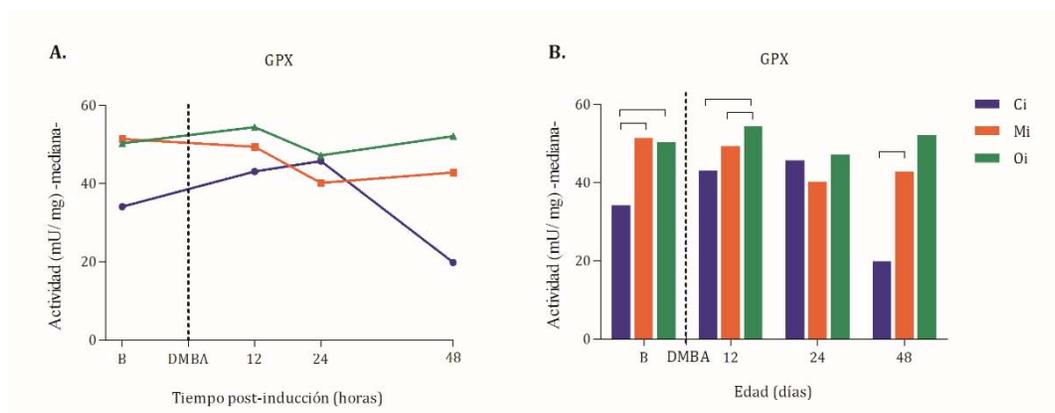
Por otra parte, los niveles de expresión de GPX1 correlacionaron positivamente con los niveles de actividad GPX en el grupo de aceite de maíz a las 24 horas, y en el grupo de aceite de oliva a las 24 y 48 horas tras la administración del DMBA (Anexo Tabla 10).



### C.

	Tiempo post-inducción (horas)				
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	87,3 ± 4,5	89,0 ± 1,2	89,3 ± 2,2	86,3 ± 4,7
	perc. 5-95	81,8 - 92,6	87,5 - 90,6	86,4 - 92,4	78,6 - 91,5
	m	87,5	88,9	89,7	87,1
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	88,3 ± 3,2	86,5 ± 7,7	87,7 ± 3,5	88,7 ± 4,9
	perc. 5-95	84,4 - 92,8	75,0 - 90,2	81,3 - 90,7	84,4 - 97,6
	m	87,8	88,5	88,8	87,2
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	88,8 ± 3,3	89,9 ± 1,9	83,9 ± 3,6	88,3 ± 1,8
	perc. 5-95	84,6 - 93,0	87,2 - 92,4	78,8 - 88,8	85,5 - 90,1
	m	89,1	89,8	83,0	88,7

**Figura 56. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de SOD tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; % inhibición: unidades de actividad enzimática.  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.



C.

		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	34,1 ± 14,1	40,0 ± 10,0	40,3 ± 13,6	19,6 ± 9,7
	perc. 5-95	15,8 - 54,2	23,3 - 49,3	23,0 - 56,1	8,4 - 34,2
	m	34,1	43,1	45,7	19,8
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	51,9 ± 17,8	47,1 ± 11,8	45,6 ± 12,6	46,2 ± 11,4
	perc. 5-95	32,0 - 79,8	29,4 - 63,4	36,2 - 69,1	32,9 - 61,2
	m	51,4	49,4	40,2	42,8
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	52,3 ± 14,0	56,2 ± 7,4	48,3 ± 15,1	49,5 ± 11,0
	perc. 5-95	37,6 - 75,0	45,9 - 65,2	29,6 - 71,8	36,3 - 60,9
	m	50,3	54,4	47,2	52,2

**Figura 57. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de GPX tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; mU/mg: unidades de actividad enzimática.  $\square$ :  $p < 0,05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

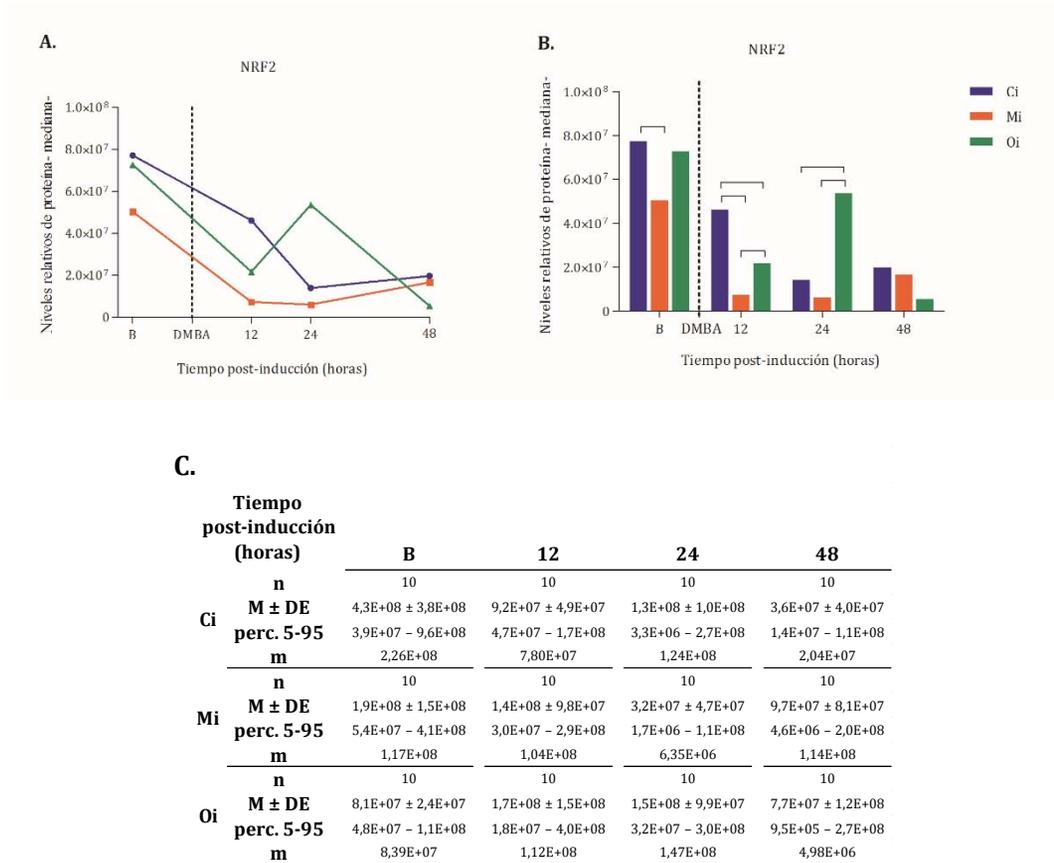
### 2.1.1.3. Regulación de la expresión génica

Con el objetivo de profundizar en el posible efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión hepática de las enzimas antioxidantes, se determinaron los niveles proteicos relativos del factor de transcripción NRF2 así como los de su retención citoplasmática.

Resultados

• **NRF2 total**

Los niveles relativos de la proteína NRF2 disminuyeron en todos los grupos experimentales tras la inducción con el carcinógeno. Únicamente el grupo de aceite de oliva mostró un aumento a 24 horas, respecto a sus niveles 12 horas antes, aunque volvió a disminuir a las 48 horas (Figura 58 A, C y Tabla 10).



**Figura 58. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de NRF2 en hígado tras la administración del carcinógeno.** A. Niveles durante la iniciación. B. Niveles en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Niveles de proteína relativizados a la cantidad de proteína por pocillo. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{\text{---}}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. N: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

En cuanto a las diferencias entre los grupos experimentales en cada de las edades analizadas de la iniciación, se observó que el grupo de aceite de maíz presentó unos

niveles significativamente inferiores a los de los otros grupos, excepto a 48 horas, donde no se observaron diferencias. El grupo de aceite de oliva también mostró niveles inferiores al grupo control, a las 12 horas, mientras que a las 24 horas post-inducción mostró unos niveles significativamente superiores a los otros dos grupos (Figura 58 B, C).

Por otro lado, los niveles de NRF2 correlacionaron positiva y significativamente con la expresión de GPX1 en el grupo control a las 24 horas. Además, dichos niveles también correlacionaron positivamente con la expresión de GR en el grupo de aceite de oliva a las 12 horas (Anexo Tabla 11).

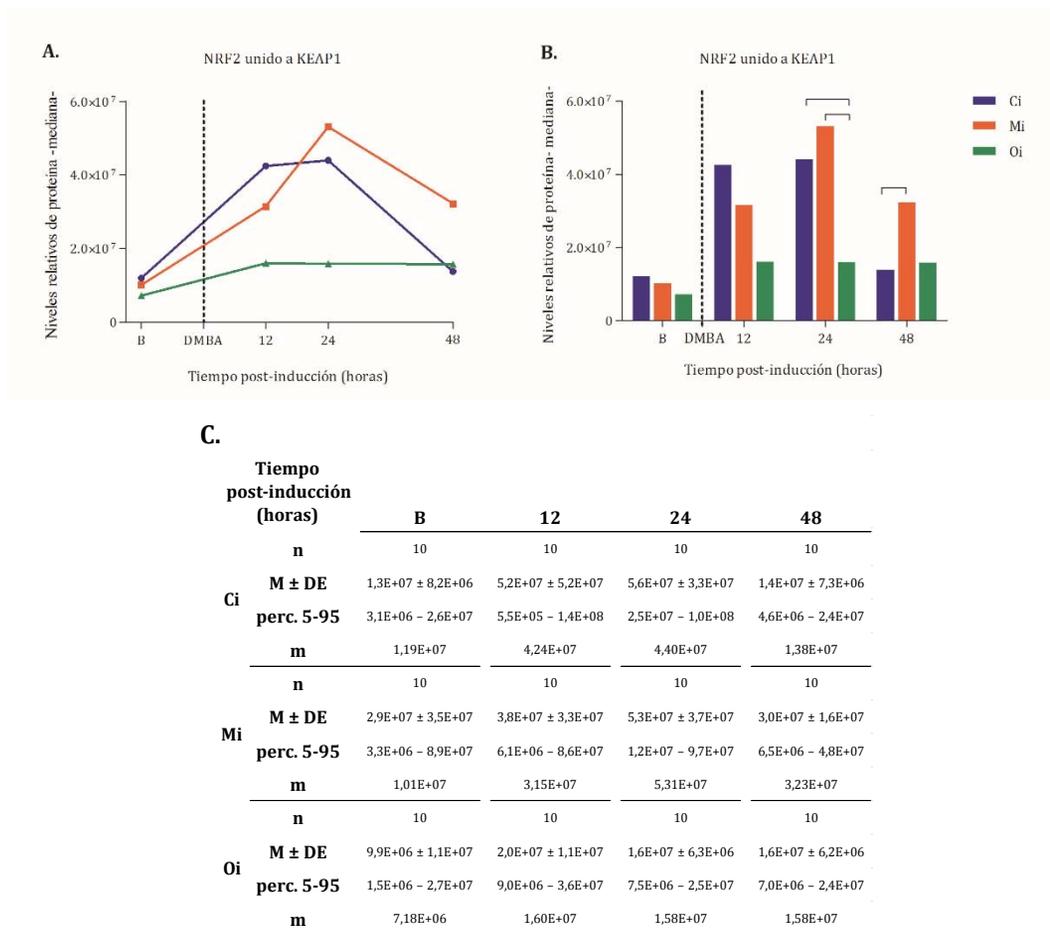
- **Retención citoplasmática de NRF2**

En referencia a los cambios encontrados en la retención citoplasmática de NRF2 tras la administración del carcinógeno, a las 24 horas se observó un aumento de los niveles de NRF2 unido a KEAP1, respecto a los basales, en el grupo control y en el de aceite de maíz. Sin embargo, a las 48 horas, dichos niveles disminuyeron situándose en un rango similar a los basales. El grupo de la dieta de aceite de oliva, pese a ser el que menos fluctuó, a las 48 horas presentó niveles superiores respecto a la situación basal (Figura 59 A, C y Tabla 10).

Al comparar los grupos experimentales en cada edad, se observó que los niveles de NRF2 unido a KEAP1, tendieron a ser inferiores en el grupo de aceite de oliva, aunque sólo de manera significativa a las 24 horas de la inducción con el DMBA. El grupo de dieta de aceite de maíz, al contrario, presentó unos niveles superiores a los del grupo de aceite de oliva en todas las edades, aunque sólo significativamente a las 24 horas (Figura 59 B, C).

Al correlacionar los niveles de NRF2 unido a KEAP 1 con los niveles de NRF2 total se obtuvo una correlación negativa en el grupo control a las 12. Los niveles de NRF2 unido a KEAP1 también correlacionaron negativamente con la expresión de GR en el grupo control a las 12 horas, y en el grupo de aceite de maíz a las 24 horas. (Anexo Tabla 11).

## Resultados



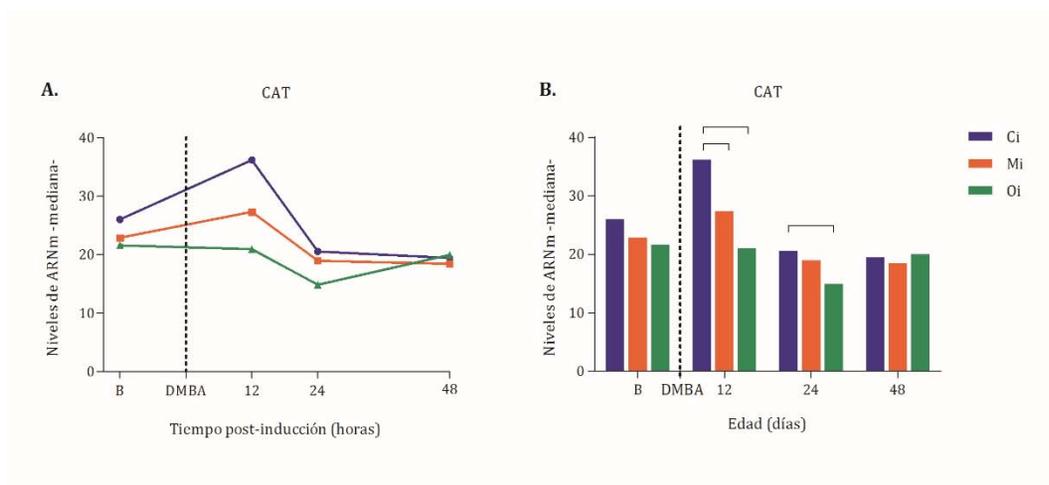
**Figura 59. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de retención citoplasmática de NRF2 en hígado tras la administración del carcinógeno.** A. Niveles durante la iniciación. B. Niveles en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. Niveles de proteína relativizados a la cantidad de proteína por pocillo. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. N: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 2.1.2. EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN GLÁNDULA MAMARIA

Al igual que en tejido hepático, se determinaron los niveles relativos de ARNm de las enzimas antioxidantes a 12, 24 y 48 horas tras la administración del carcinógeno, correspondientes a 53,5, 54 y 55 días de edad, respectivamente, tomando como referencia el estado basal (52 días).

- **Catalasa**

En cuanto a los niveles de expresión de CAT, se observó que 12 horas post-inducción, el grupo control mostró un aumento de éstos. Sin embargo, a 24 horas, se observó una disminución de los niveles de expresión de CAT en todos los grupos experimentales, que terminaron siendo, a 48 horas, similares a los basales (Figura 60 A, C y Tabla 10).



## C.

		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	23,8 ± 11,7	38,9 ± 11,0	22,4 ± 5,8	21,9 ± 6,5
	perc. 5-95	4,5 - 36,3	27,6 - 54,8	16,7 - 31,6	15,0 - 31,4
	m	26,0	36,2	20,5	19,4
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	23,0 ± 10,2	27,3 ± 7,4	18,5 ± 7,3	19,5 ± 6,1
	perc. 5-95	9,1 - 36,7	18,7 - 38,0	9,2 - 28,6	12,8 - 29,2
	m	22,9	27,3	19,0	18,4
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	22,9 ± 8,3	20,9 ± 7,2	14,9 ± 4,7	20,6 ± 6,7
	perc. 5-95	13,7 - 36,2	11,5 - 31,0	9,3 - 22,1	13,5 - 30,2
	m	21,6	21,0	13,6	20,0

**Figura 60. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima CAT en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{\overline{\quad}}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados

El análisis en cada una de las edades estudiadas mostró una tendencia de los grupos de las dietas hiperlipídicas a presentar una menor expresión de CAT que el grupo control. Esta disminución fue significativa a 12 y a 24 horas en el grupo de aceite de oliva y a 12 horas en el de aceite de maíz. A las 48 horas de la administración del DMBA, los tres grupos mostraron niveles de expresión similares entre sí (Figura 60 B, C).

Por otro lado, se obtuvo una correlación negativa y significativa entre los niveles de expresión de CAT en hígado y los niveles en glándula mamaria a 24 horas en el grupo de aceite de maíz y a 48 horas en el grupo control (Anexo Tabla 12).

### • Superóxido dismutasa 1

Al analizar los niveles de expresión de SOD1 durante el período de la iniciación, se observó que los grupos de aceite de maíz y control aumentaron dichos niveles 12 horas después de la administración del carcinógeno respecto a los basales. A continuación, se observó una disminución de la expresión hasta unos niveles similares a los basales a las 48 horas. En cuanto al grupo de aceite de oliva, éste no modificó sus niveles de expresión a lo largo del periodo analizado (Figura 61 A, C y Tabla 10).

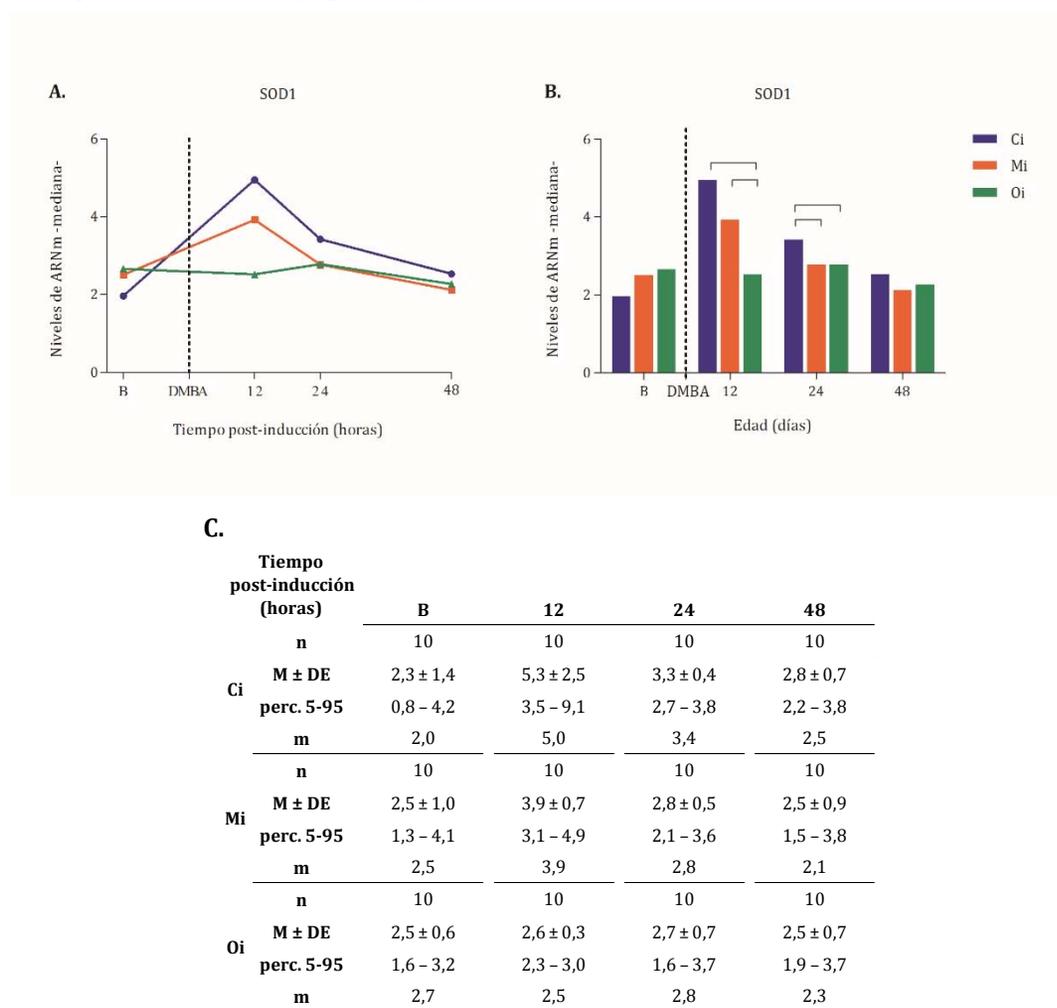
Comparando los diferentes grupos experimentales en cada una de las edades, se observó una tendencia por parte de los grupos de dietas hiperlipídicas a presentar una menor expresión de SOD1 respecto al grupo control. Así, a 12 y 24 horas post-inducción, dichos grupos mostraron unos niveles inferiores a éste último (Figura 61 B, C).

Al correlacionar los niveles de expresión de SOD1 en glándula mamaria con los obtenidos en hígado, se observó una correlación positiva y significativa en el grupo de aceite de maíz a las 24 horas, y una correlación negativa y significativa en el grupo control a las 48 horas (Anexo Tabla 12).

### • Superóxido dismutasa 2

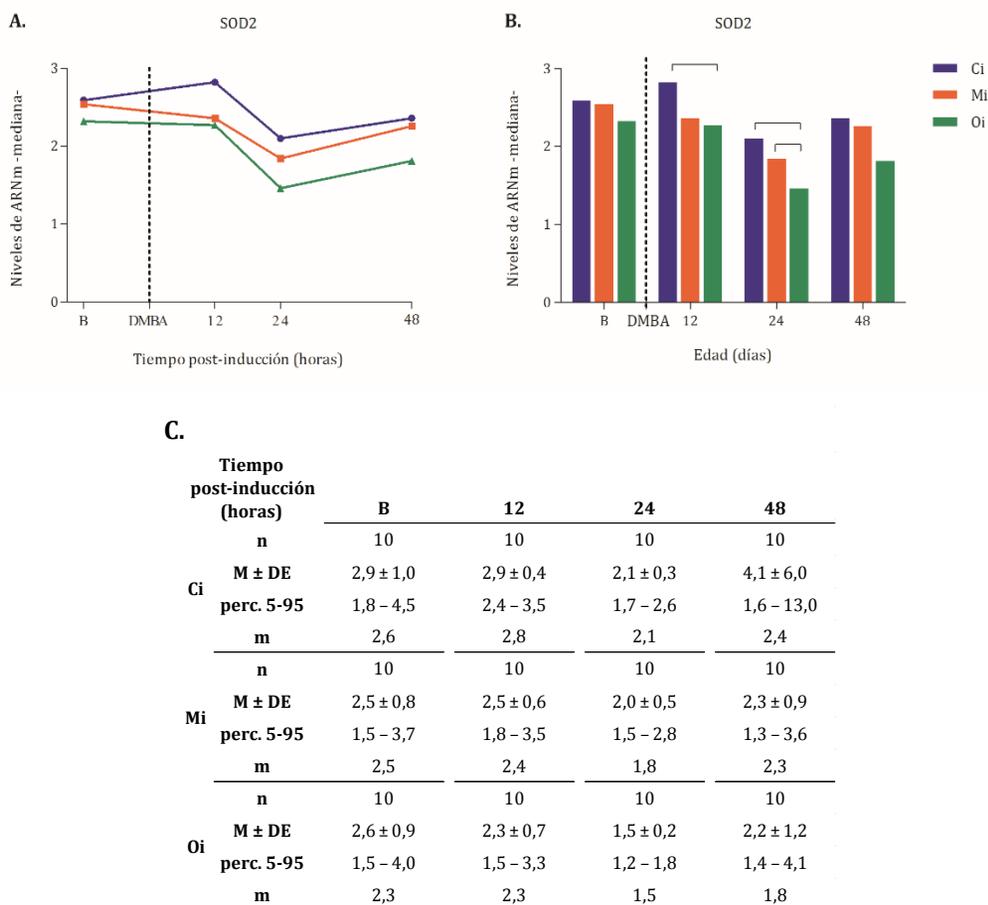
Los resultados del análisis de expresión de SOD2 mostraron que tras la administración del carcinógeno, en concreto 24 horas después, se produjo una disminución de la expresión en todos los grupos experimentales. Esta disminución

estuvo seguida por un aumento a 48 horas de manera que todos los grupos retornaron a los niveles basales (Figura 62 A, C y Tabla 10). Al analizar las diferencias entre los grupos experimentales, se observó que los de dietas hiperlipídicas tendieron a mostrar una menor expresión de SOD2 respecto al grupo control. Las diferencias fueron significativas a las 12 y las 24 horas de la inducción (Figura 62 B, C). Estas diferencias fueron similares a las encontradas en los niveles de expresión de SOD1 (Figura 61).



**Figura 61. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD1 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados

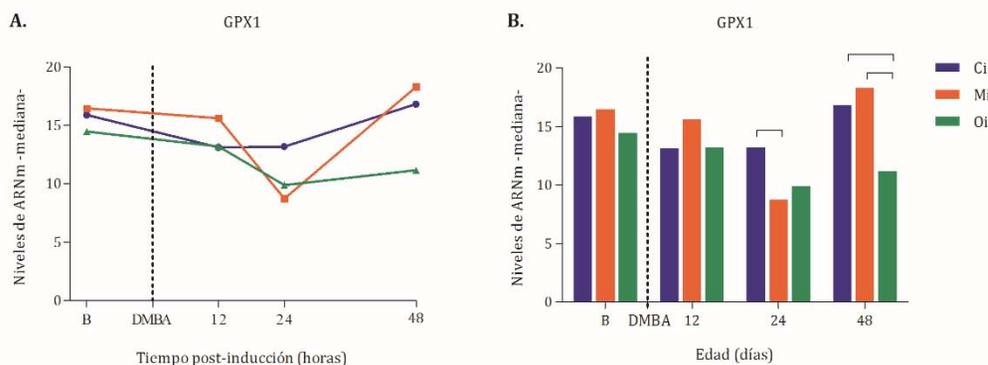


**Figura 62. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima SOD2 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

No se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de SOD2 en glándula mamaria y los obtenidos en hígado (Anexo Tabla 12). En cambio, la expresión de SOD2 correlacionó positivamente con la de SOD1 en el grupo de aceite de oliva en el momento previo a la administración del carcinógeno y a las 48 horas, y en el grupo control a las 48 horas de manera negativa (Anexo Tabla 13).

## • Glutación peroxidasa 1

Los resultados de la expresión de GPX1 mostraron que los grupos de las dietas hiperlipídicas disminuyeron sus niveles de expresión tras la administración del carcinógeno, concretamente 24 horas después. Sin embargo, a las 48 horas se recuperaron los niveles basales (Figura 63 A, C y Tabla 10).



### C.

		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	16,7 ± 4,4	13,6 ± 2,0	12,9 ± 3,6	18,9 ± 8,0
	perc. 5-95	11,7 - 24,0	11,4 - 16,5	7,3 - 17,3	10,4 - 32,2
	m	15,9	13,1	13,2	16,8
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	16,2 ± 3,9	15,4 ± 3,2	8,6 ± 2,7	17,1 ± 4,5
	perc. 5-95	10,3 - 21,3	10,8 - 19,1	5,0 - 12,6	10,9 - 22,2
	m	16,5	15,6	8,7	18,3
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	15,4 ± 6,0	13,8 ± 3,6	10,1 ± 2,1	11,9 ± 2,3
	perc. 5-95	9,4 - 24,4	9,5 - 19,5	7,1 - 12,5	9,3 - 15,1
	m	14,5	13,2	9,9	11,2

**Figura 63. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX1 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

Al comparar los niveles de expresión de GPX1 entre los diferentes grupos experimentales, se observó que a las 24 horas post-inducción el grupo de aceite de

## Resultados

maíz mostraba unos niveles inferiores a los del grupo control, mientras que a 48 horas fue la dieta de aceite de oliva la que se asoció a una menor expresión respecto a las otras dietas (Figura 63 B, C). La tendencia observada en el tejido hepático a presentar mayores niveles de expresión de GPX1 en los grupos de dietas hiperlipídicas no se reprodujo en glándula mamaria.

Por otra parte, en general la expresión de GPX1 en glándula mamaria no correlacionó con la expresión en hígado. Únicamente se obtuvo una correlación negativa y significativa en el grupo control a las 24 horas tras la administración del carcinógeno (Anexo Tabla 12).

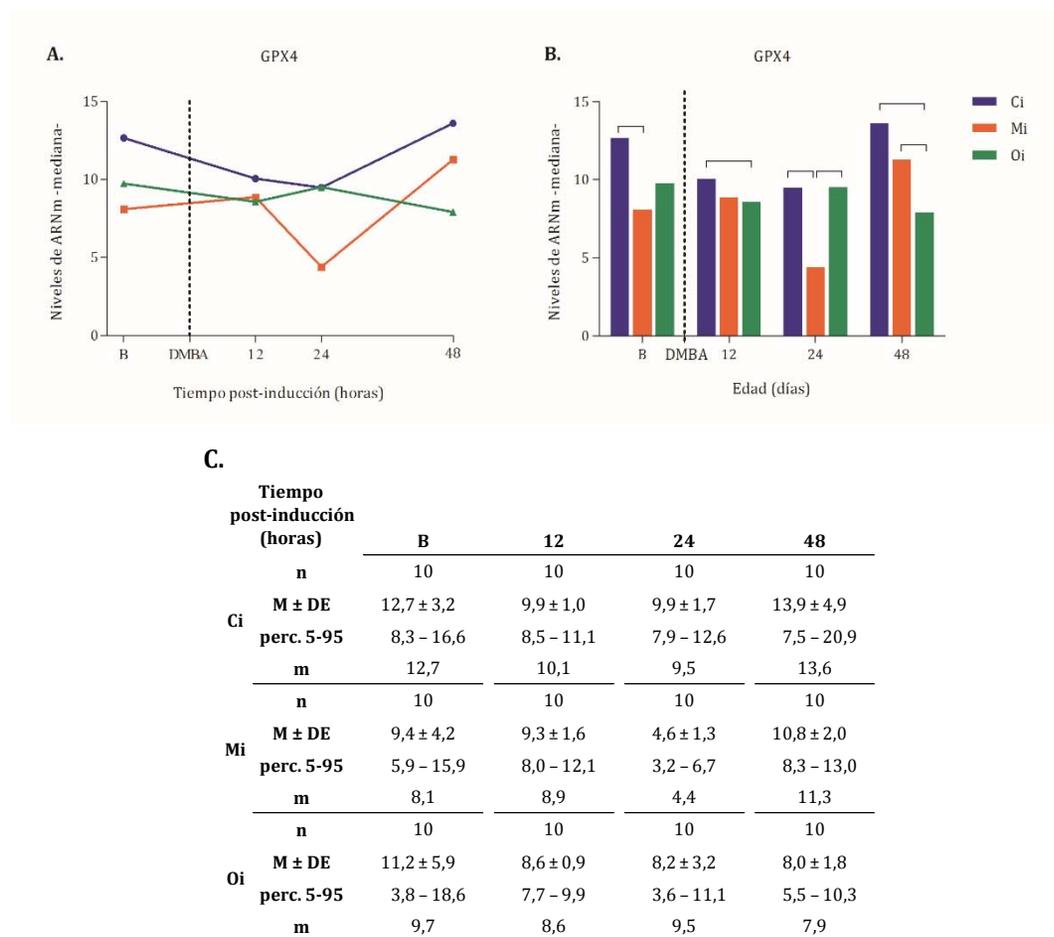
### • **Glutación peroxidasa 4**

Tras la administración del carcinógeno no se observó un comportamiento único en los niveles de ARNm de GPX4 en los diferentes grupos experimentales. Así, a las 24 horas se observó una disminución en el grupo control y en el de dieta de aceite de maíz. Dicha disminución estuvo seguida de un aumento de expresión en estos grupos hasta alcanzar unos niveles similares a los basales en el grupo control y un aumento respecto los basales en el grupo de aceite de maíz. El grupo de aceite de oliva, por otro lado, no modificó significativamente sus niveles de expresión tras la administración del carcinógeno (Figura 64 A, C y Tabla 10).

Respecto las diferencias entre los grupos experimentales en cada edad, las dietas hiperlipídicas se asociaron, generalmente, a unos niveles inferiores de expresión de GPX4 que el grupo control. Así, el grupo de aceite de maíz mostró niveles significativamente inferiores a los de los otros dos grupos 24 horas después de la administración del carcinógeno, mientras que la dieta de aceite de oliva se asoció a niveles inferiores al control a las 12 y las 48 horas. En esta última edad las diferencias fueron también significativas respecto al grupo de aceite de maíz. (Figura 64 B, C).

Al comparar los niveles de expresión de GPX4 en glándula mamaria con los obtenidos en hígado, únicamente se observó una correlación negativa y significativa en el grupo control 24 horas después de la administración del carcinógeno (Anexo Tabla 12). Además, la expresión de GPX4 correlacionó positivamente con la de GPX1 de forma significativa en el grupo de aceite de oliva en el momento previo a la

administración del carcinógeno y a las 48 horas, así como en el grupo control a las 48 horas (Anexo Tabla 14).



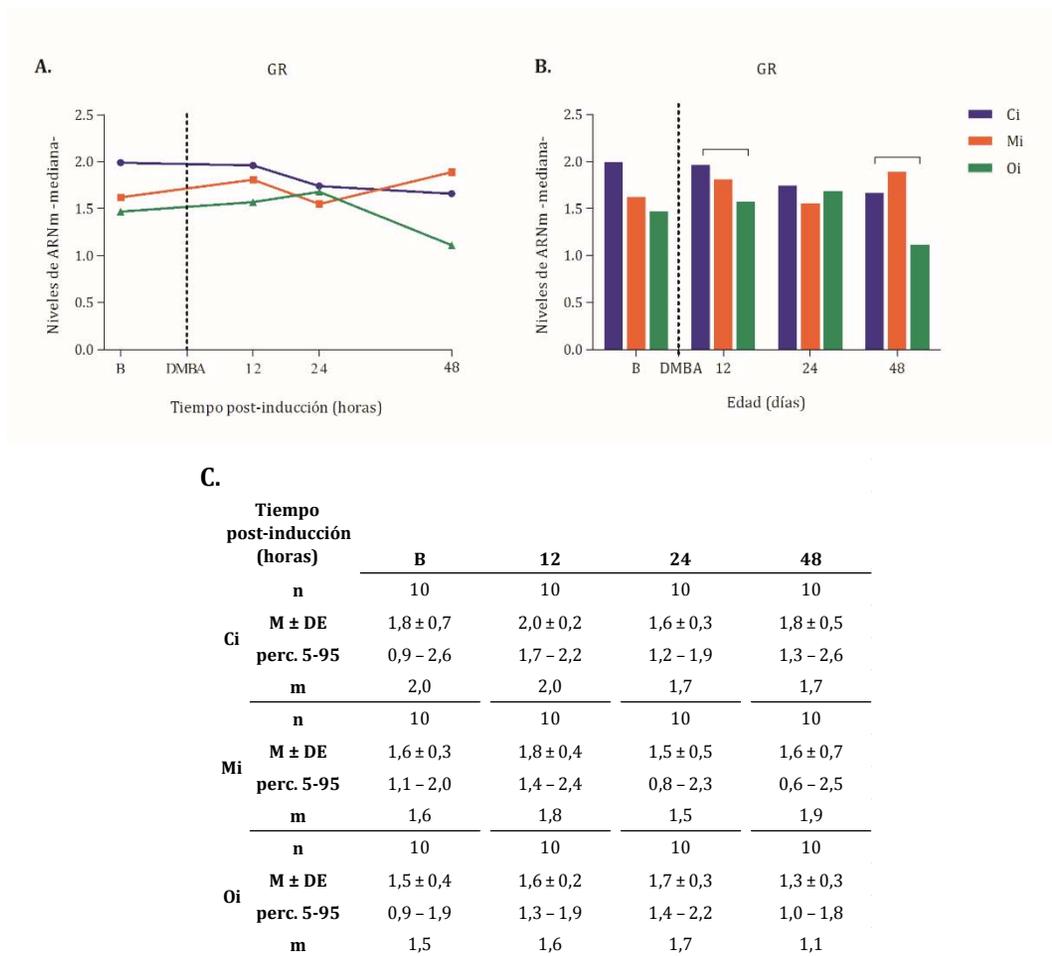
**Figura 64. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ - $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### • Glutación reductasa

Al analizar los niveles de expresión de GR en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno, no se observaron grandes cambios en los grupos experimentales, de manera que a las 48 horas todos ellos mostraron niveles

## Resultados

similares a los basales. Únicamente el grupo de aceite de oliva disminuyó significativamente la expresión de GR a las 48 horas respecto a las 12 horas post-inducción (Figura 65 A, C y Tabla 10).



**Figura 65. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GR en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

En cuanto a las diferencias entre los grupos experimentales en cada una de las edades estudiadas, en el grupo de aceite de oliva se observó una tendencia a presentar valores inferiores a los del grupo control. Las diferencias fueron significativas a las 12 y 48 horas tras la administración del carcinógeno (Figura 65 B,

C). Esta tendencia fue más o menos similar a la encontrada en hígado, donde las dietas hiperlipídicas se asociaron en la mayoría de las edades a unos niveles de expresión de GR inferiores a los del grupo control (Figura 59 B).

No se obtuvieron correlaciones significativas entre los niveles de GR en hígado y en glándula mamaria (Anexo Tabla 12).

## **2.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA. NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN.**

El estudio de la defensa antioxidante no enzimática en el periodo de la iniciación consistió en la determinación de los niveles plasmáticos de glutatión en sus formas oxidada (GSSG) y reducida (GSH), así como sus niveles totales (GSH + GSSG) y las ratios GSH/GSH total y GSH/ GSSG, en estado basal (previo a la administración del carcinógeno) y a las 12, 24 y 48 horas post-inducción.

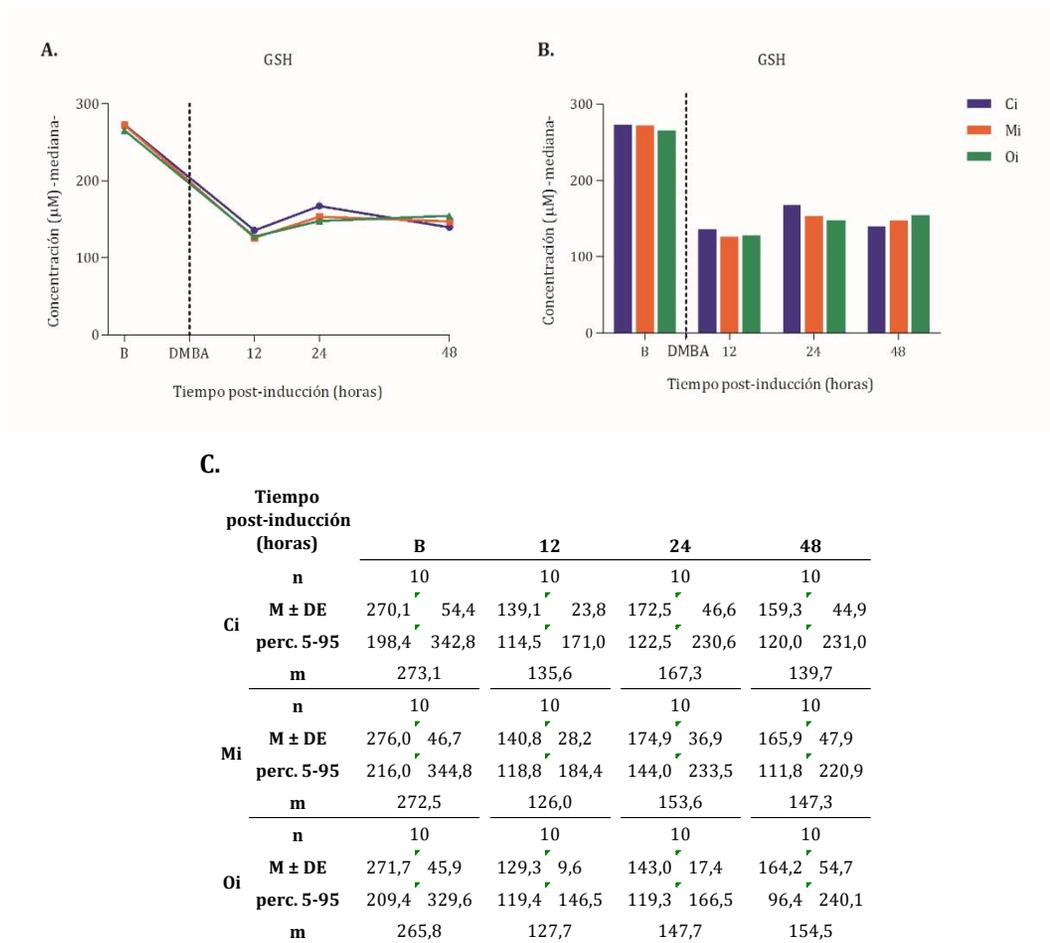
### **2.2.1. GSH**

A las 12 horas de la administración del carcinógeno se observó una disminución significativa de los niveles plasmáticos de GSH en todos los grupos experimentales. Tras esta disminución, los niveles se mantuvieron por debajo de los basales (Figura 66 A, C y Tabla 10).

No se hallaron diferencias significativas entre los niveles de GSH de los diferentes grupos experimentales (Figura 66 B, C).

Por otra parte, al correlacionar los niveles de GSH con los de la actividad hepática de GPX se obtuvo una correlación negativa en el grupo de aceite de oliva en el momento previo a la administración del carcinógeno, así como una correlación positiva en el grupo de aceite de maíz a las 24 horas (Anexo Tabla 16).

## Resultados



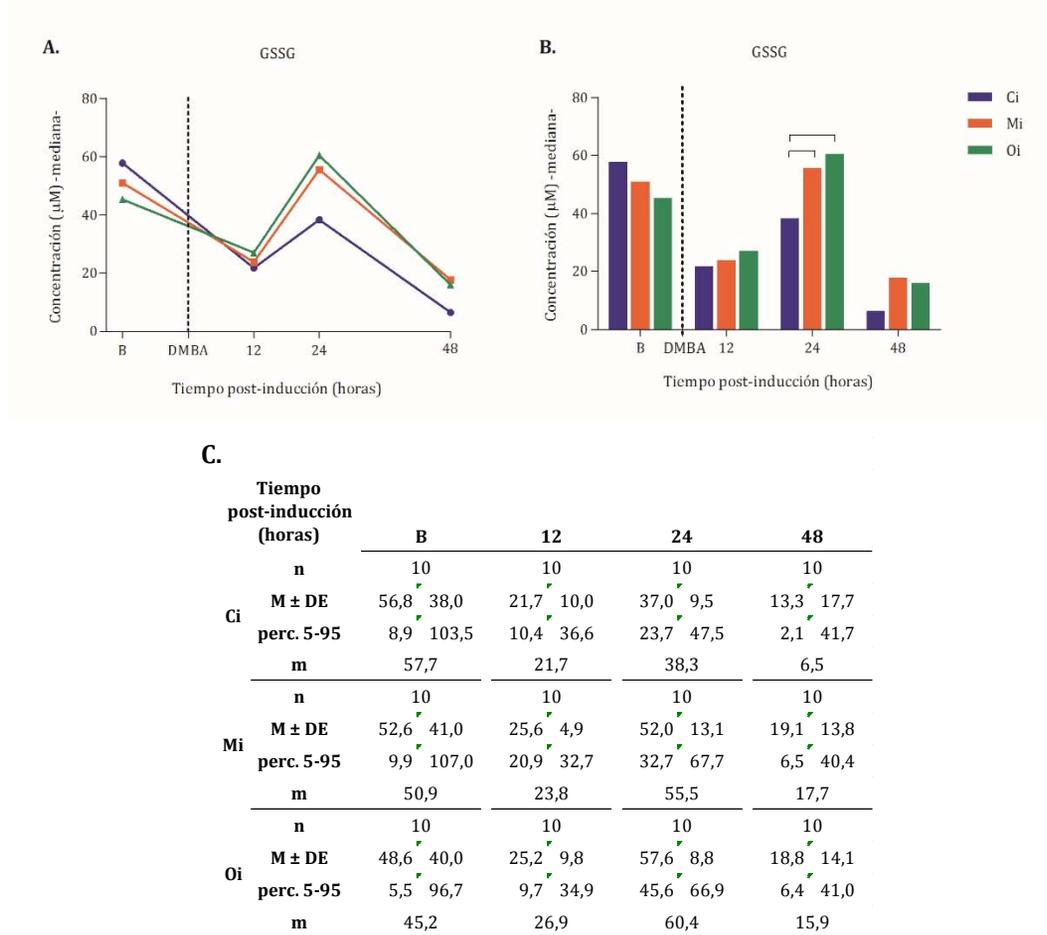
**Figura 66. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH ( $\mu\text{M}$ ) en plasma tras la administración del carcinógeno.** A. Concentración durante la iniciación. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\neg$ :  $p < 0,05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 2.2.2. GSSG

Al igual que sucedió con los niveles plasmáticos de GSH, 12 horas después de administración del DMBA también se observó una disminución de los niveles de GSSG en todos los grupos experimentales, aunque dicha disminución sólo fue significativa en el caso del grupo control. Sin embargo, 12 horas más tarde los niveles de GSSG aumentaron, y finalmente, a las 48 horas post-inducción volvieron a

disminuir hasta valores inferiores a los basales en todos los grupos experimentales (Figura 67 A, C y Tabla 10).

En general, no se observaron grandes cambios en los niveles plasmáticos de GSSG entre los diferentes grupos. Únicamente a las 24 horas los grupos de dietas hiperlipídicas mostraron unos niveles superiores al control. A las 12 y 48 horas se observó esa misma tendencia pero no fue estadísticamente significativa (Figura 67 B, C).



**Figura 67. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSSG (µM) en plasma tras la administración del carcinógeno.** A. Concentración durante la iniciación. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; †: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados

Los niveles plasmáticos de GSSG y de GSH se correlacionaron positivamente de forma significativa en estado basal en los tres grupos experimentales; en el grupo control a las 12 horas; en el grupo de aceite de maíz a las 24 horas; y en el grupo de aceite de oliva a las 24 y 48 horas (Anexo Tabla 15). Además, los niveles de GSSG se correlacionaron negativamente con los de la actividad GPX a las 24 horas de la administración del carcinógeno en el grupo control y en el grupo de aceite de maíz (Anexo Tabla 16).

### 2.2.3. GSH total

Los niveles de glutatión disminuyeron significativamente en todos los grupos experimentales a las 12 horas de la administración del carcinógeno. Sin embargo, a las 24 horas, se observó un aumento significativo en todos los grupos y un nuevo descenso a las 48 horas, significativo en los grupos control y de aceite de maíz. Los valores finales fueron significativamente inferiores a los basales en todos los grupos (Figura 68 A, C y Tabla 10).

Al comparar los niveles de GSH total entre los diferentes grupos experimentales en cada una de las edades, no se encontraron diferencias significativas (Figura 68 B, C).

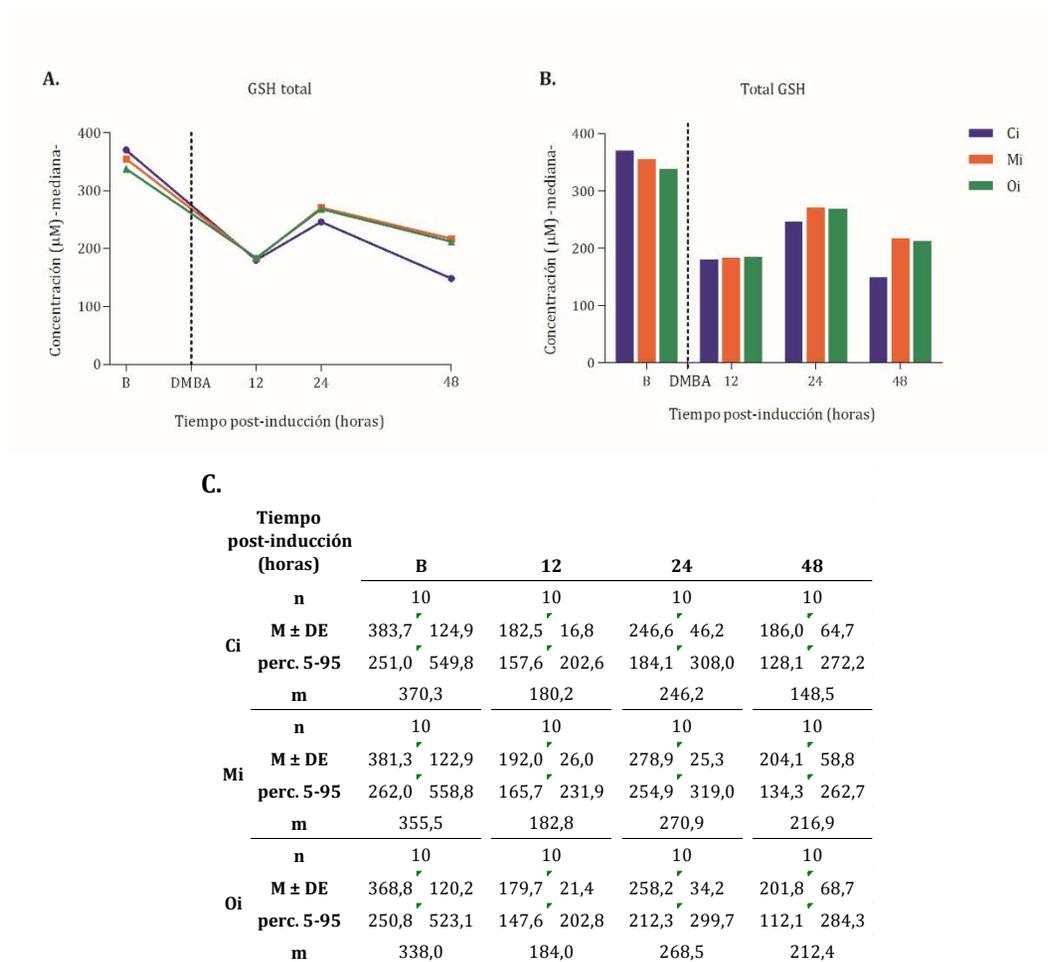
Por otra parte, los niveles de GSH total y los niveles de GSH, en general, correlacionaron positiva y significativamente en todos los grupos experimentales. Este hecho también se observó al correlacionar los niveles de GSH total y GSSG salvo en algunos grupos en edades concretas (Anexo Tabla 15).

### 2.2.4. Ratio GSH/GSH total

La ratio GSH/GSH total disminuyó en los grupos de dietas hiperlipídicas a las 24 horas de la administración del carcinógeno. Posteriormente aumentó hasta retornar a los valores basales a las 48 horas. En cambio, el grupo control presentó una ratio superior a la basal a las 48 horas (Figura 69 A, C y Tabla 10).

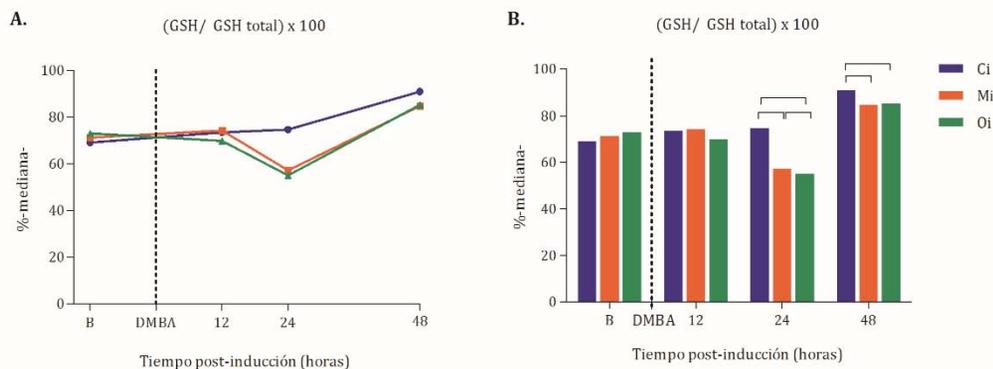
Al comparar la ratio GSH/GSH total entre los diferentes grupos experimentales, se observó que las dietas hiperlipídicas se asociaban a valores inferiores a los de la

dieta control a 24 y 48 horas post-carcinógeno. A las 24 horas, el grupo de dieta de aceite de oliva fue el que presentó los valores más bajos (Figura 69 B, C).



**Figura 68. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de GSH total (µM) en plasma tras la administración del carcinógeno.** A. Concentración durante la iniciación. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; <sup>f</sup>: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados



**C.**

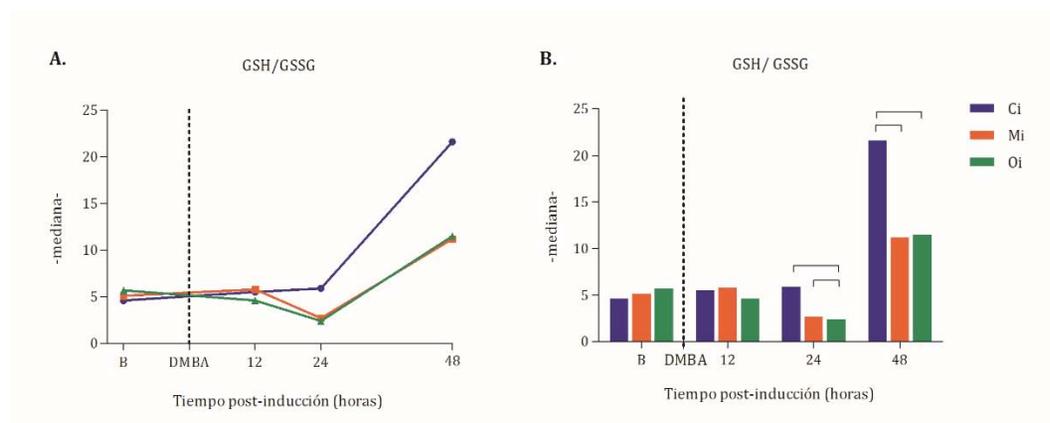
Tiempo post-inducción (horas)		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	73,4 ± 12,4	76,2 ± 10,3	69,3 ± 9,0	88,3 ± 12,0
	perc. 5-95	62,4 - 93,0	62,1 - 89,2	58,2 - 77,8	69,6 - 96,7
	m	69,1	73,5	74,7	91,0
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	75,9 ± 13,8	72,9 ± 6,0	62,4 ± 9,7	82,1 ± 9,8
	perc. 5-95	60,8 - 92,9	64,6 - 81,3	54,4 - 77,4	65,2 - 91,2
	m	71,2	74,2	57,2	84,8
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	77,5 ± 14,6	72,9 ± 10,0	55,5 ± 1,6	82,4 ± 9,0
	perc. 5-95	63,0 - 95,8	64,4 - 89,4	53,4 - 57,5	67,3 - 89,1
	m	73,0	69,8	55,0	85,2

**Figura 69. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/ GSH total (%) en plasma tras la administración del carcinógeno.** A. Ratio durante la iniciación. B. Ratio en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; —: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 2.2.5. Ratio GSH/GSSG

La ratio GSH/GSSG fue constante en el grupo control hasta 24 horas después de la administración del carcinógeno, mientras en los grupos de dietas hiperlipídicas se observó una disminución de la ratio a 24 horas respecto a 12 horas. Sin embargo, en los tres grupos experimentales se observó un aumento de la ratio a las 48 horas, de

manera que los grupos de dietas hiperlipídicas retornaron a los valores basales, mientras los del grupo control fueron significativamente superiores (Figura 70 A, C y Tabla 10).



		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	10,3 ± 13,6	8,3 ± 5,2	5,0 ± 1,9	28,1 ± 21,6
	perc. 5-95	3,3 - 33,5	3,3 - 16,7	2,8 - 7,0	7,1 - 62,8
	m	4,6	5,5	5,9	21,6
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	11,2 ± 10,1	5,7 ± 1,8	3,8 ± 1,9	11,7 ± 6,2
	perc. 5-95	3,1 - 26,7	3,7 - 8,7	2,4 - 6,9	4,1 - 21,6
	m	5,1	5,8	2,7	11,2
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	16,7 ± 18,9	20,1 ± 48,4	2,5 ± 0,2	11,1 ± 4,1
	perc. 5-95	3,4 - 47,8	3,6 - 90,0	2,3 - 2,7	4,8 - 16,4
	m	5,7	4,6	2,4	11,5

**Figura 70. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la ratio GSH/GSSG en plasma tras la administración del carcinógeno.** A. Ratio durante la iniciación. B. Ratio en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

Al comparar la ratio GSH/GSSG entre los grupos experimentales, se observó que a 24 y 48 horas los dos grupos de dietas hiperlipídicas mostraron unos niveles significativamente inferiores a los del grupo control (Figura 70 B, C).

## Resultados

Por otro lado, se obtuvieron correlaciones negativas significativas entre los valores de la ratio GSH/GSSG y los de GSH antes de la administración del carcinógeno en los 3 grupos experimentales; y correlaciones positivas a las 12 horas en los grupos control y de aceite de maíz de manera positiva; y a las 24 horas en el grupo de aceite de maíz. Además, también se correlacionaron positivamente los valores de la ratio GSH/GSSG y los niveles de GSH total 12 horas antes de la administración del carcinógeno en los tres grupos experimentales, y a las 48 horas en el grupo control. Finalmente, la ratio GSH/GSSG y los niveles de GSSG correlacionaron negativa y significativamente en todos los grupos experimentales a todas las edades (Anexo Tabla 15).

### 2.2.6. Expresión hepática de Glutación Sintasa (GSS)

La ausencia de diferencias entre los diferentes grupos experimentales en los niveles plasmáticos de GSH y GSH total (Figuras 66 y 68), sugirió la posible influencia de la dieta sobre otros parámetros relacionados con el glutación, como la expresión de la enzima GSS, una de las enzimas limitantes de su síntesis.

Los niveles de expresión de GSS tendieron a aumentar a las 24 horas de la administración del carcinógeno en todos los grupos, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo (Figura 71 A, C y Tabla 10).

Además, los niveles de expresión de GSS no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales Figura 71 B, C).

Por otro lado, no se obtuvieron correlaciones significativas entre los niveles de expresión de GSS y los niveles de GSH total (Anexo Tabla 17).

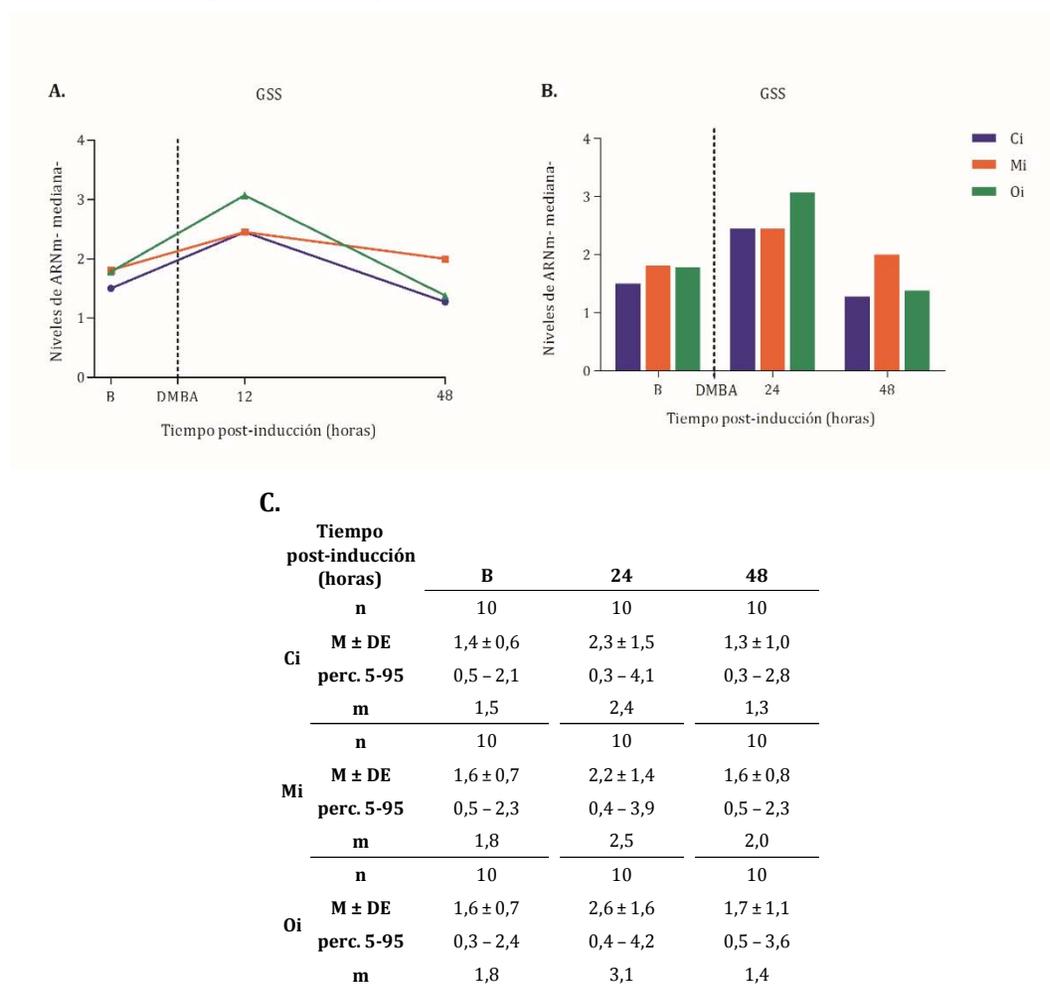
### 2.2.7. Actividad hepática Glutación Reductasa (GR)

Con el fin de profundizar en el ciclo del GSH y en las diferencias halladas entre grupos experimentales, además de la actividad GPX, se determinó la actividad de la enzima responsable de la regeneración del GSSG en GSH, la GR. Se determinaron sus niveles en estado basal y a las 48 horas de la administración del carcinógeno, ya que en ésta última edad fue a la que se hallaron diferencias significativas en la expresión de GR entre los grupos experimentales.

Los resultados mostraron que a las 48 horas de la administración del DMBA, se produjo un aumento de los niveles de actividad en el grupo de aceite de maíz respecto sus niveles basales (Figura 72 y Tabla 10).

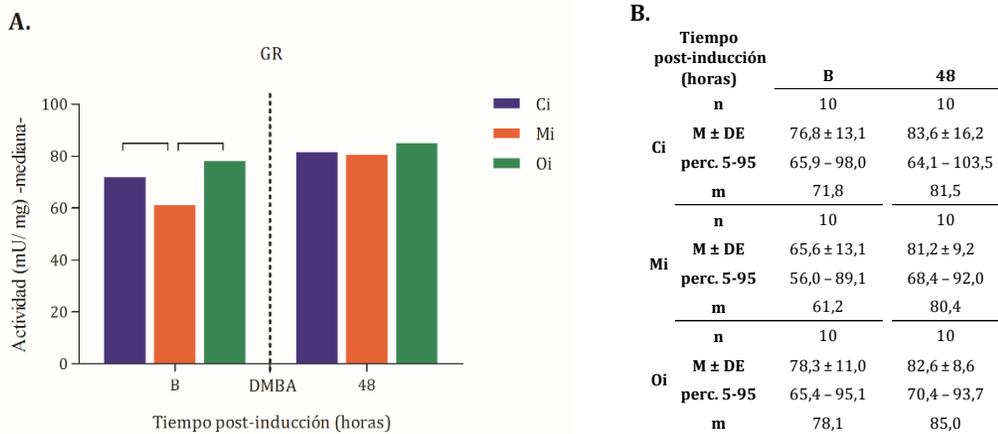
Además en estado basal, el grupo de aceite de maíz presentó unos menores niveles de actividad de GR que los otros dos grupos (Figura 7 A).

Por otra parte, no se obtuvieron correlaciones significativas entre los niveles de actividad de GR y los de GSH (Anexo Tabla 18).



**Figura 71. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima GSS en hígado tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{-}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## Resultados



**Figura 72. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad hepática de GR tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; mU/mg: unidades de actividad enzimática relativizadas a mg de proteína.  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

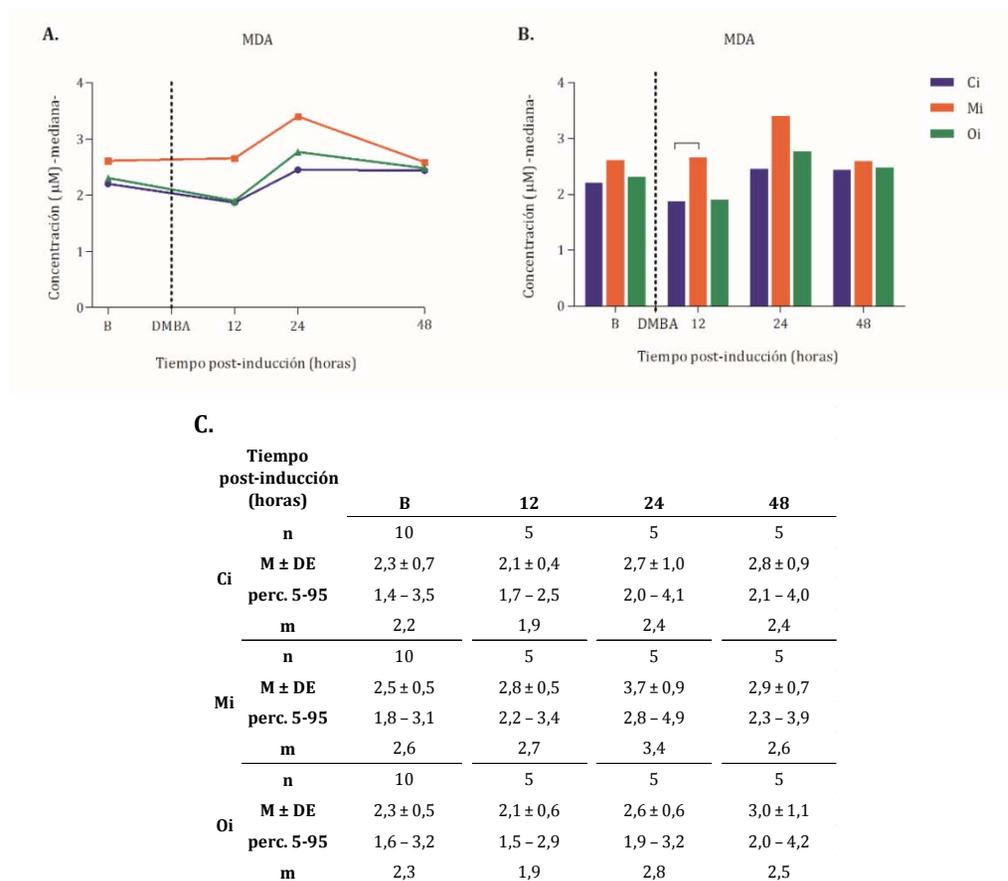
### 2.3. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO EN MACROMOLÉCULAS DURANTE LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.

Para evaluar los posibles efectos de los lípidos de la dieta sobre el daño en macromoléculas tras la administración del carcinógeno, se analizaron los niveles de daño oxidativo en lípidos y proteínas en plasma, mediante la determinación del MDA, así como los niveles de daño en el ADN en glándula mamaria, mediante la determinación de la base modificada 8-OHdG y el Comet.

#### 2.3.1. DAÑO OXIDATIVO EN LÍPIDOS. NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA

Al analizar los niveles plasmáticos de MDA, no se observaron cambios significativos en ningún grupo experimental. Únicamente, el grupo de aceite de maíz presentó un aumento de sus niveles a las 24 horas respecto a sus niveles basales (Figura 73 A, C y Tabla 10).

El análisis de las diferencias entre los grupos experimentales en cada una de las edades estudiadas mostró una tendencia por parte del grupo de aceite de maíz a mayores niveles de MDA en comparación a los otros dos grupos. Sin embargo, las diferencias sólo fueron significativas a las 12 horas de la inducción carcinogénica (Figura 73 B, C).



**Figura 73. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma tras la administración del carcinógeno.** A. Concentración durante la iniciación. B. Concentración en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\text{---}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### **2.3.2. DAÑO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA**

Para continuar con el estudio del daño causado por el estrés oxidativo en las macromoléculas, se determinó el daño oxidativo en el ADN en el órgano diana del carcinógeno, la glándula mamaria.

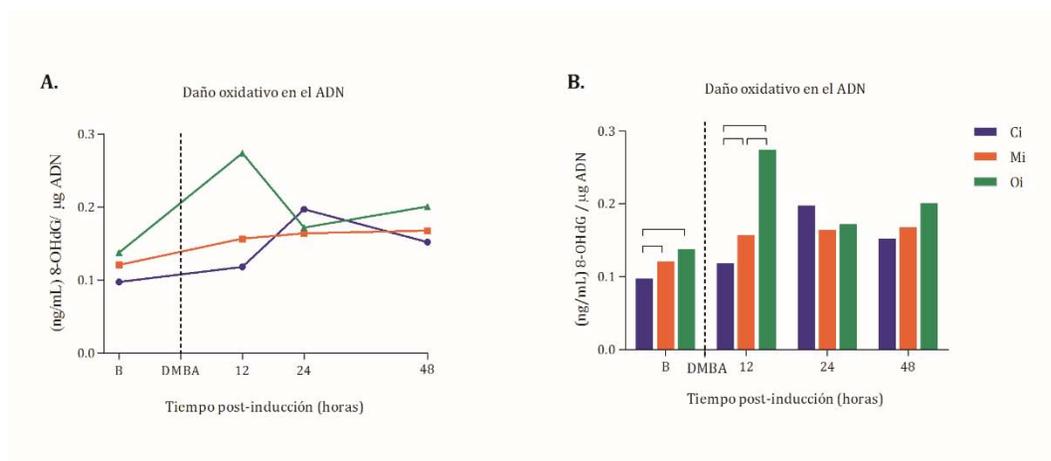
Este daño se evaluó de dos maneras diferentes: el daño oxidativo en el ADN, mediante la determinación de la base modificada 8-OHdG, y el daño general en el ADN, cuantificado mediante la técnica del Comet.

#### **2.3.2.1. Daño oxidativo. Niveles de 8-OHdG**

Los resultados del análisis de los niveles de 8-OHdG en glándula mamaria mostraron que los grupos de las dietas hiperlipídicas presentaban un aumento significativo de sus niveles a las 12 horas de la administración del carcinógeno respecto a sus niveles basales, mientras que la dieta control no aumentó dichos niveles hasta 24 horas después de la inducción (Figura 74 A, C y Tabla 10). Al comparar los niveles de daño al final de la iniciación con los niveles basales en cada grupo, se observó que los grupos de dietas hiperlipídicas mostraron unos niveles superiores, mientras que el grupo control mantuvo sus niveles similares a los previos (Figura 74 B, C y Tabla 10).

Atendiendo a las diferencias entre los grupos experimentales en cada edad, se observó que en el momento previo a la inducción los grupos de dietas hiperlipídicas mostraron unos mayores niveles de 8-OHdG que el grupo control (Figura 74 B). Además, a las 12 horas de administrar el carcinógeno, dichos grupos continuaron presentando unos mayores niveles de dicha base modificada que la dieta control, siendo en este caso el grupo de aceite de oliva el que presentó los valores más altos y el grupo de aceite de maíz los valores intermedios. A partir de las 24 horas desde la administración del DMBA, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos (Figura 74 B).

Por otra parte, no se hallaron correlaciones significativas entre los niveles de 8-OHdG y los de MDA, ni entre los de 8-OHdG y los de proteínas oxidadas (Anexo Tabla 19).



**C.**

		Tiempo post-inducción (horas)			
		B	12	24	48
Ci	n	10	10	10	10
	M ± DE	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,25 ± 0,12	0,15 ± 0,05
	perc. 5-95	0,07 0,13	0,06 0,18	0,12 0,42	0,09 0,22
	m	0,10	0,12	0,20	0,15
Mi	n	10	10	10	10
	M ± DE	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,03
	perc. 5-95	0,09 0,15	0,13 0,19	0,07 0,29	0,13 0,22
	m	0,12	0,16	0,16	0,17
Oi	n	10	10	10	10
	M ± DE	0,13 ± 0,03	0,29 ± 0,10	0,18 ± 0,08	0,22 ± 0,07
	perc. 5-95	0,10 0,17	0,17 0,45	0,11 0,31	0,14 0,32
	m	0,14	0,27	0,17	0,20

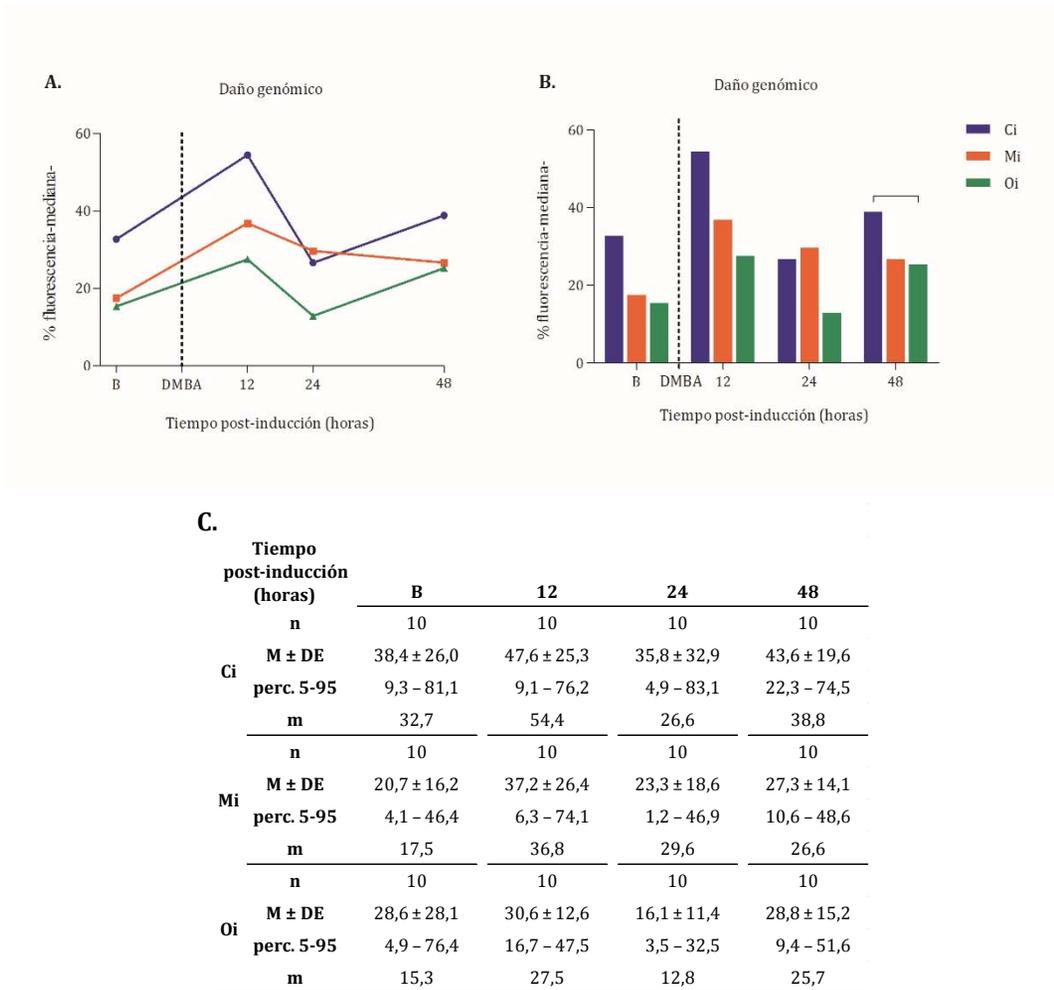
**Figura 74. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de 8-OHdG en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** A. Durante la iniciación. B. En cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno; (ng/mL) 8-OHdG/μg ADN: unidades de 8-OHdG relativizadas a μg de ADN. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; ---:  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 2.3.2.2. Daño oxidativo y no oxidativo: Comet

A pesar de las diferencias observadas en los niveles de daño genómico en cada grupo experimental durante la iniciación, el análisis estadístico únicamente mostró diferencias significativas en la disminución de dicho daño en el grupo de aceite de oliva de las 12 a las 24 horas post-inducción (Figura 75 A, C y Tabla 10).

## Resultados

Asimismo, al comparar el nivel de daño genómico entre grupos en cada una de las edades analizadas, a pesar de las diferencias observadas, ninguna fue significativa, a excepción del menor daño en el grupo de aceite de oliva respecto al control a las 48 horas post-inducción (Figura 75 B, C).



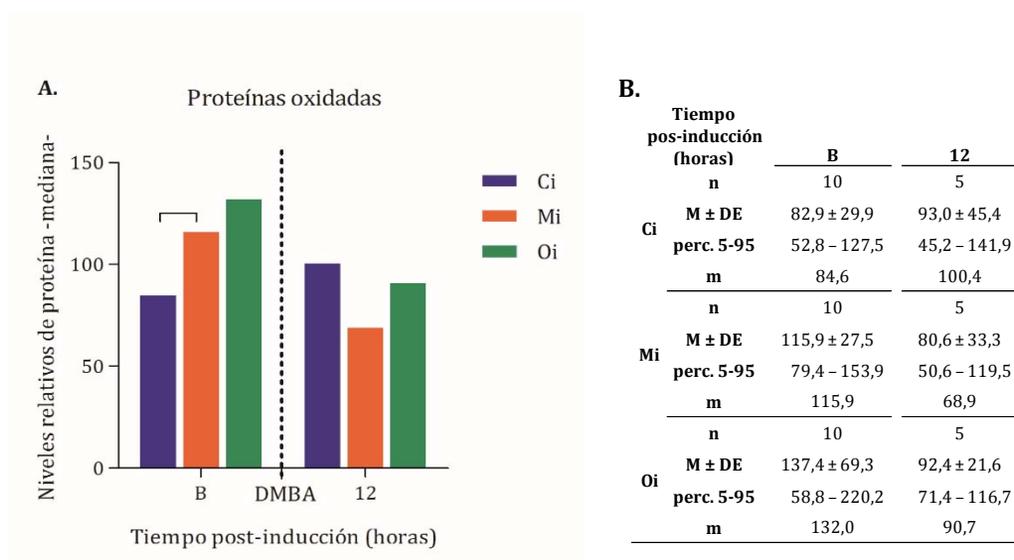
**Figura 75. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de daño genómico total tras la administración del carcinógeno en glándula mamaria.** A. Durante la iniciación. B. En cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. % fluorescencia: unidades de daño. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 2.3.3. DAÑO OXIDATIVO EN PROTEÍNAS EN PLASMA

Para completar el análisis del daño en macromoléculas se inició el estudio del daño oxidativo a nivel de proteínas plasmáticas. Para ello se analizaron muestras de 52 días (estado basal) y 12 horas post-inducción.

Los resultados, mostraron unos niveles significativamente superiores en el grupo de aceite de maíz respecto la dieta control a 52 días. Después de la inducción con el carcinógeno no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 76 A, B).

Por otra parte, no se halló ninguna correlación entre los niveles de proteínas oxidadas y los de MDA, ni entre los niveles de proteínas oxidadas y los de 8-OHdG (Anexo Tabla 19).



**Figura 76. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de proteínas oxidadas en plasma tras la administración del carcinógeno.** Niveles durante la iniciación. B. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\neg$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

## **2.4. REPARACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA**

Para completar el estudio del daño oxidativo genómico también se analizó la reparación de este daño en el tejido mamario. Para ello, se determinaron los niveles de expresión de las dos enzimas principales encargadas de la reparación del daño genómico por estrés oxidativo, la OGG y la PARP.

### **2.4.1. Expresión de OGG**

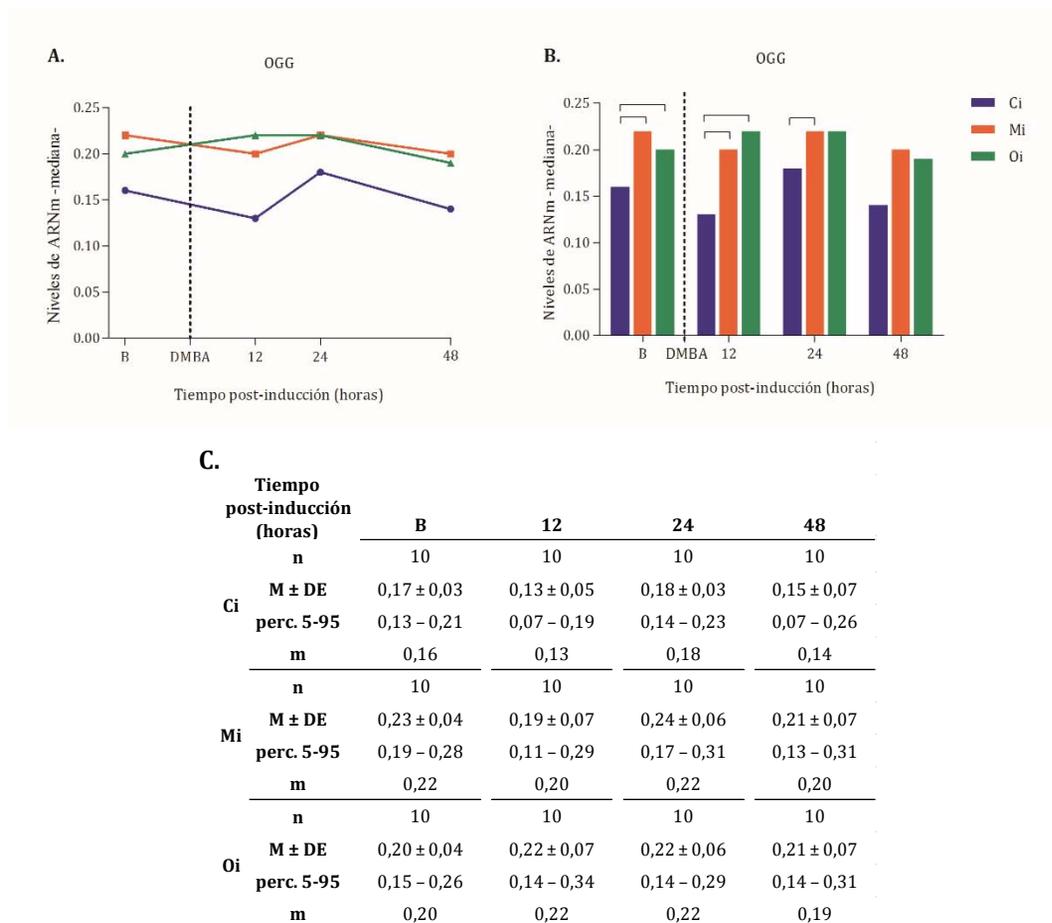
Los resultados del análisis de la expresión de OGG no mostraron grandes cambios tras la administración del DMBA. Únicamente el grupo control mostró un aumento significativo de los niveles del ARNm relativo de OGG a 24 horas respecto a los niveles a 12 horas. Los grupos de las dietas hiperlipídicas no modificaron sus respectivos niveles de expresión a lo largo de la iniciación (Figura 77 A, C y Tabla 10).

En cuanto a las diferencias entre grupos, en general, los de las dietas hiperlipídicas se asociaron unos niveles superiores de expresión que los de la dieta control. Este aumento fue significativo para los dos grupos de dietas hiperlipídicas antes de la administración del carcinógeno así como a las 12 horas post-inducción. A las 24 horas el aumento sólo fue significativo para el grupo de aceite de maíz (Figura 77 B, C).

Los niveles de expresión de OGG y los de 8-OHdG únicamente correlacionaron positiva y significativamente en el momento previo a la inducción en el grupo control (Anexo Tabla 20).

### **2.4.2. Expresión de PARP**

Respecto los niveles de expresión de PARP, en los grupos de dietas hiperlipídicas no se obtuvieron diferencias significativas durante la iniciación, a pesar de ligeras modificaciones observadas en dichos niveles de expresión. En cambio, en el grupo control los cambios observados a lo largo del tiempo fueron significativos y los niveles de PARP a las 48 horas de la inducción fueron superiores a los basales (Figura 78 A, C y Tabla 10).

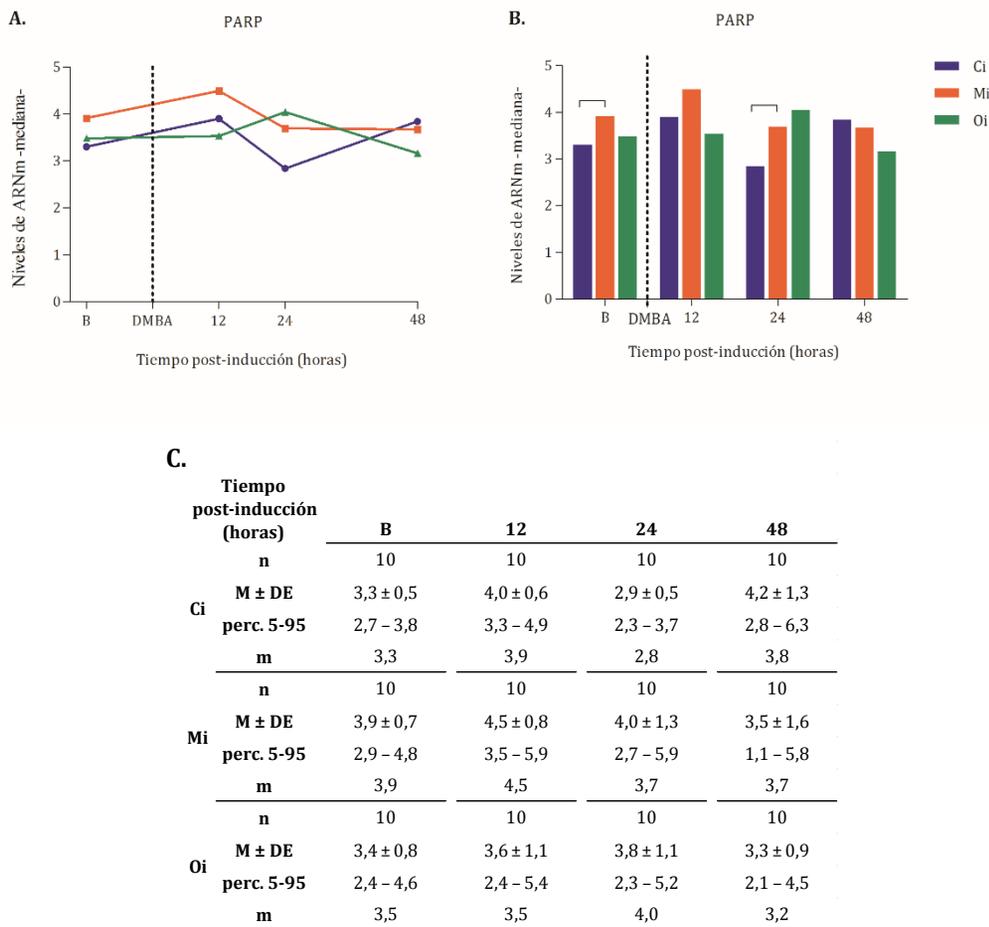


**Figura 77. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima OGG en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{\text{---}}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

Al comparar los niveles de expresión entre las diferentes dietas en cada una de las edades, se observó que antes de la inducción el grupo de dieta aceite de maíz mostró unos niveles significativamente superiores de expresión que los del control. Además, a las 12 y 24 horas de la administración del DMBA se repitió este mismo patrón, aunque sólo con diferencias significativas a las 24 horas. El grupo de dieta de aceite de oliva no mostró diferencias significativas con el grupo control a ninguna edad (Figura 78 B, C).

## Resultados

Por otro lado, los niveles de expresión de PARP correlacionaron positivamente con los de 8-OHdG a las 12 horas tras la administración del DMBA en el grupo de aceite de maíz (Anexo Tabla 20). Además, la expresión de PARP en general correlacionó con la de OGG positivamente salvo en algunos grupos en edades concretas (Anexo Tabla 20).



**Figura 78. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima PARP en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.** Expresión durante la iniciación. B. Expresión en cada una de las edades estudiadas. C. Parámetros estadísticos. B: niveles basales (52 días); DMBA: administración del carcinógeno. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\square$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

**Tabla 10. Efecto de los lípidos de la dieta sobre diferentes parámetros de estrés oxidativo en la iniciación de la carcinogénesis mamaria.**

Tiempo (horas post-inducción)	B vs. 12 h			12 h vs. 24 h			24 h vs. 48 h			B vs. 24 h			B vs. 48 h			12 h vs. 48 h		
	Ci	Mi	Oi	Ci	Mi	Oi	Ci	Mi	Oi	Ci	Mi	Oi	Ci	Mi	Oi	Ci	Mi	Oi
<b>Hígado</b>																		
Expresión																		
CAT	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.405	0.545	0.545	0.879	0.879	0.705	0.198	1.000	0.705	0.001	0.000	0.000
SOD1	0.002	0.364	0.820	0.001	0.000	0.000	0.820	0.939	0.069	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
SOD2	0.495	0.081	0.289	0.081	0.003	0.034	0.448	0.140	0.140	0.240	0.003	0.650	0.069	0.225	0.570	0.037	0.019	0.820
GPX1	0.019	0.000	0.000	0.010	0.000	0.003	0.226	0.596	0.939	0.570	0.820	0.762	#	0.545	0.449	0.198	0.000	0.000
GPX4	0.364	0.006	0.005	0.005	0.000	0.000	0.004	0.001	0.096	0.001	0.001	0.006	0.256	0.019	0.733	0.000	0.000	0.000
GR	0.025	0.289	0.018	0.427	0.023	0.002	0.677	0.000	0.000	0.004	0.001	0.000	0.006	0.545	0.120	0.570	0.545	0.306
GSS				0.174	0.290	0.174	0.174	0.199	0.064	0.151	0.199	0.064	0.545	0.677	0.762			
<b>Plasma</b>																		
Actividad																		
CAT	0.006	0.034	0.939	0.198	0.058	0.820	0.198	0.198	0.198	0.028	0.173	0.705	0.705	0.820	0.058	0.041	0.112	0.130
SOD	0.650	0.496	0.596	0.879	0.650	0.001	0.130	0.289	0.004	0.405	0.762	0.010	0.762	0.705	0.650	0.112	0.112	0.069
GPX	0.096	0.596	0.405	0.596	0.364	0.041	0.003	0.820	0.820	0.325	0.545	0.705	0.019	0.596	0.820	0.001	0.879	0.198
GR													0.597	0.080	0.174			
NRF2 total	0.023	0.006	0.000	0.001	0.879	0.000	0.001	0.405	0.000	0.000	0.002	0.198	0.000	0.001	0.000	0.023	0.226	0.015
NRF2-KEAP1	0.082	0.256	0.017	0.405	0.226	0.449	0.000	0.226	0.879	0.000	0.058	0.027	0.449	0.041	0.096	0.096	0.705	0.545
<b>G. mamaria</b>																		
Expresión																		
CAT	0.012	0.198	0.705	0.000	0.028	0.049	0.762	0.762	0.034	0.325	0.325	0.015	0.325	0.449	0.650	0.002	0.019	0.820
SOD1	0.002	0.004	0.705	0.001	0.001	0.325	0.041	0.172	0.240	0.096	0.256	0.622	0.495	0.820	0.384	0.000	0.004	0.150
SOD2	0.545	1.000	0.449	0.000	0.049	0.003	0.495	0.545	0.013	0.041	0.130	0.002	0.307	0.449	0.081	0.081	0.496	0.150
GPX1	0.058	0.545	0.596	0.596	0.000	0.007	0.058	0.000	0.112	0.082	0.000	0.006	0.820	0.650	0.063	0.226	0.384	0.364
GPX4	0.041	0.325	0.705	0.939	0.000	0.384	0.058	0.000	0.449	0.041	0.000	0.496	0.596	0.041	0.198	0.023	0.112	0.325
GR	1.000	0.344	0.570	0.006	0.120	0.120	0.791	0.762	0.006	0.427	0.596	0.173	0.820	1.000	0.364	0.044	0.545	0.037
OGG	0.128	0.240	0.704	0.018	0.197	0.969	0.120	0.270	0.568	0.381	0.761	0.517	0.323	0.286	0.909	0.595	0.820	0.621
PARP	0.010	0.211	0.879	0.000	0.226	0.496	0.012	0.650	0.364	0.129	0.820	0.405	0.049	0.289	0.791	0.820	0.069	0.650
<b>Dañ. ADN</b>																		
8-OHdG	0.082	0.001	0.000	0.004	0.821	0.014	0.070	0.821	0.226	0.000	0.028	0.151	0.040	0.010	0.070	0.096	0.364	0.096
COMET	0.405	0.130	0.256	0.449	0.150	0.019	0.449	0.879	0.086	0.705	0.879	0.496	0.449	0.289	0.462	0.650	0.496	1.000

B: niveles basales; NRF2-KEAP1: NRF2 unido a KEAP1; Prot. Ox.: proteínas oxidadas; Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; p-valor<0.05 (en rojo) en test estadístico de U de Mann Whitney.

### **3. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL, LA CARCINOGENESIS MAMARIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES INDUCIDOS CON EL CARCINÓGENO**

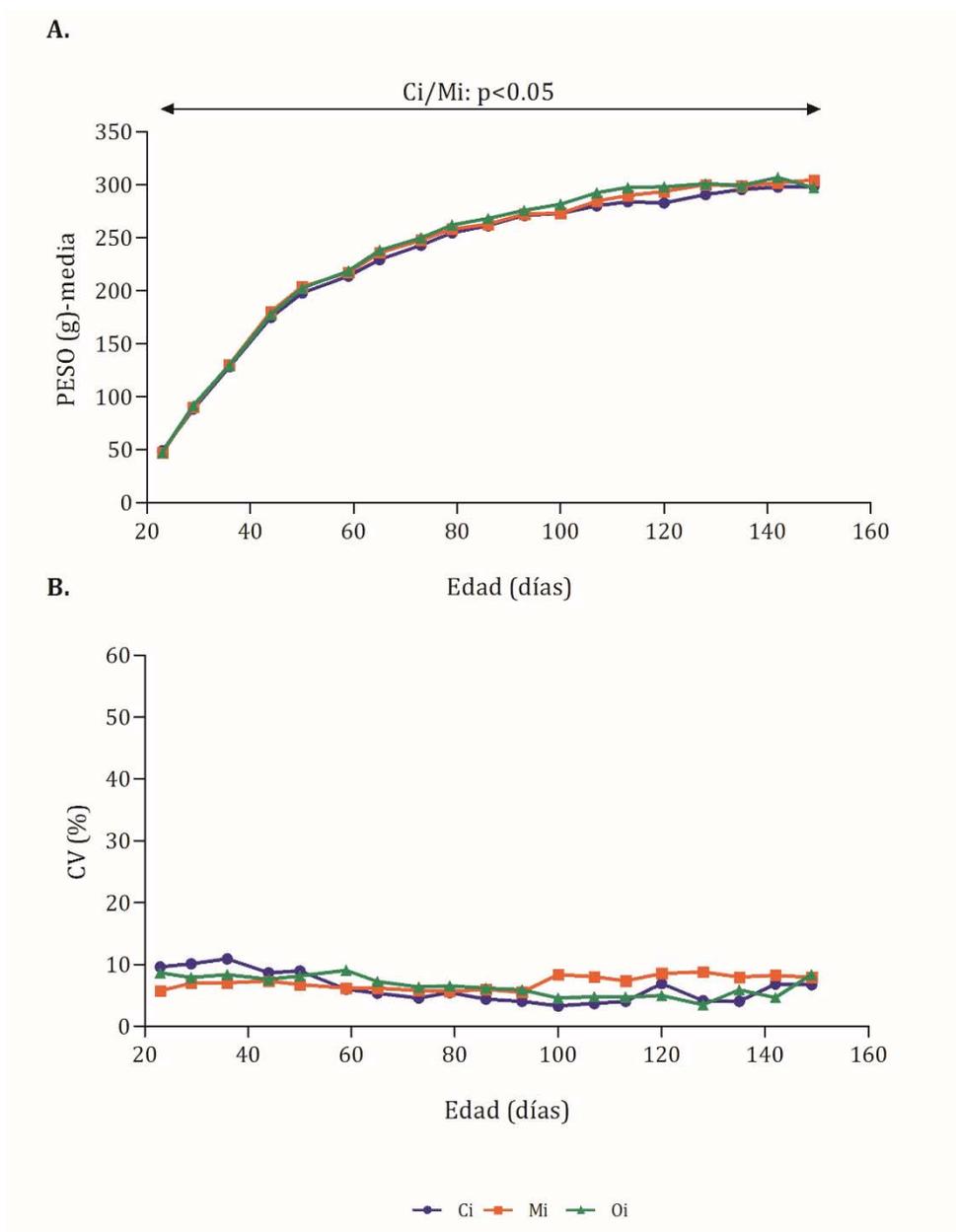
Con el fin de estudiar el papel de los efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en el desarrollo del cáncer de mama inducido químicamente con DMBA, se analizaron diversos parámetros relacionados con dicho estrés en los animales adultos (100 y 150 días de edad) previamente inducidos con el carcinógeno. El desarrollo del cáncer de mama se analizó mediante el análisis morfológico de las estructuras epiteliales proliferativas, el grado de densidad de la glándula mamaria y, fundamentalmente, diversos parámetros clínicos de la carcinogénesis (tiempo de latencia, incidencia y contenido y volumen tumoral). Además, y en primer lugar, se realizó el estudio del crecimiento de los animales, a través del análisis de la evolución ponderal y de la masa corporal, junto con la exploración de las posibles patologías causadas por desequilibrios nutricionales.

#### **3.1. EVOLUCIÓN PONDERAL Y DE LA MASA CORPORAL**

El análisis de la evolución ponderal se efectuó a partir de los datos obtenidos en las 20 determinaciones semanales del peso. Por su parte, el estudio de la masa corporal se basó en el Índice de Lee y el Índice de Masa Corporal, determinados a partir de esos mismos datos del peso además de los correspondientes a la longitud naso-anal. En la Figura 79 se muestra la evolución ponderal media y la de los coeficientes de variación del peso corporal de los diferentes grupos experimentales. Tal como se puede observar, los pesos fueron homogéneos a lo largo del estudio y los coeficientes de variación uniformemente bajos y de evolución constante en todos ellos.

El análisis de los resultados mostró que los animales inducidos alimentados con la dieta de aceite de maíz tuvieron un peso significativamente superior a los animales alimentados con la dieta control. A diferencia de lo ocurrido en los

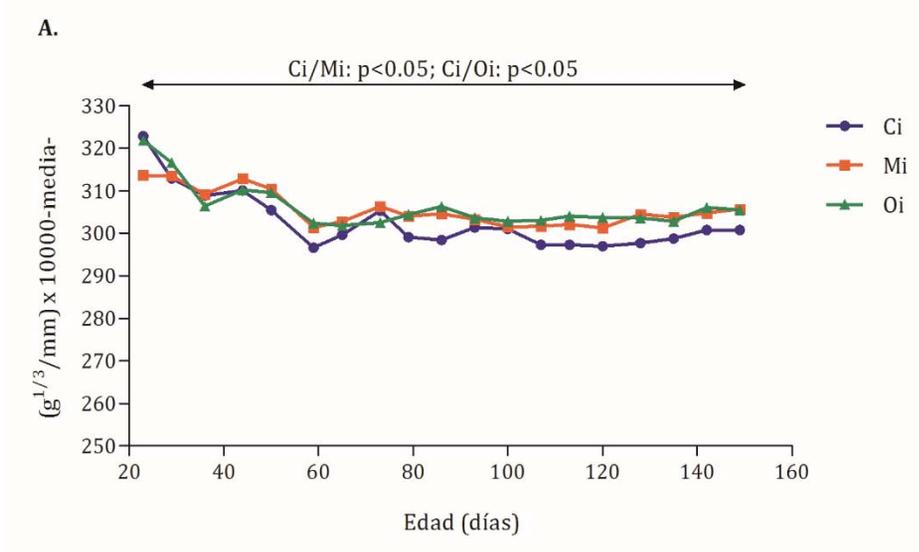
animales sanos, en los animales inducidos el grupo de aceite de oliva no mostró diferencias respecto al grupo de aceite de maíz.



**Figura 79. Evolución y coeficiente de variación ponderales de los animales inducidos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.** A. Evolución del peso corporal a lo largo del tiempo. B. Coeficiente de variación del peso corporal a lo largo del tiempo. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

## Resultados

En relación al análisis de la evolución de la masa corporal, los animales alimentados con dietas hiperlipídicas mostraron un Índice de Lee significativamente superior a los alimentados con la dieta control. No se hallaron diferencias significativas entre los dos tipos de dietas hiperlipídicas (Figura 80 A, B).

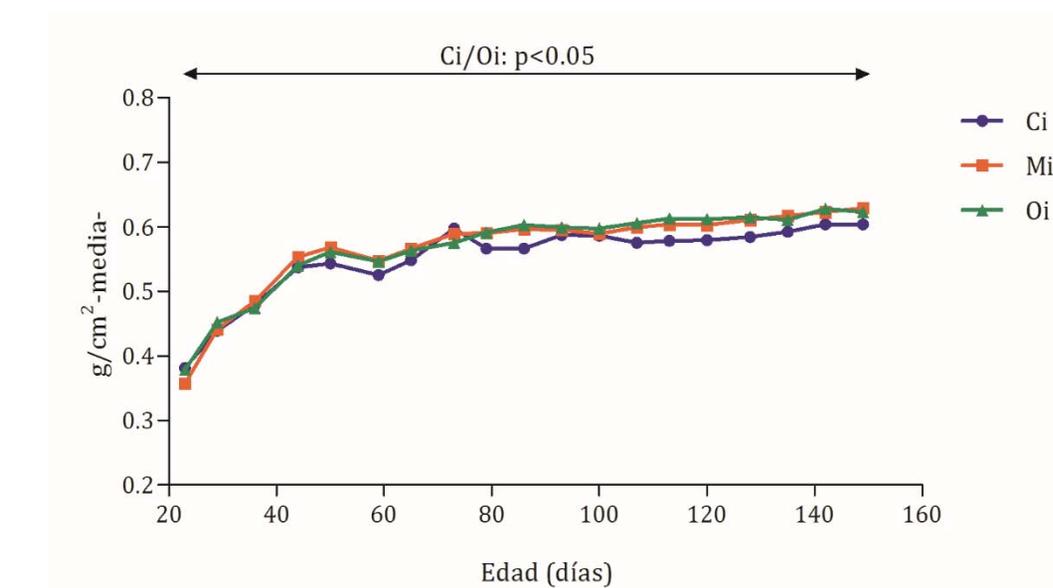


B.

Tiempo (días)	52	53,5	54	55	58	63	100	150
<b>Ci</b>								
n	5	10	10	10	10	10	10	10
Media	307,55	301,44	300,04	293,69	297,34	294,87	302,00	300,73
DS	4,37	8,07	8,21	7,57	6,13	5,06	4,23	7,11
CV%	1,42	2,68	2,74	2,58	2,06	1,72	1,40	2,36
Mediana	306,46	302,92	302,88	294,60	297,65	295,14	300,25	299,75
<b>Mi</b>								
n	5	10	10	10	10	10	10	10
Media	307,93	300,64	298,42	292,15	298,14	300,37	300,89	305,72
DS	6,75	9,12	5,09	15,80	6,69	5,59	4,60	5,35
CV%	2,19	3,03	1,71	5,41	2,25	1,86	1,53	1,75
Mediana	309,45	302,71	298,68	294,54	296,77	301,02	300,85	305,58
<b>Oi</b>								
n	5	10	10	10	10	9	10	9
Media	309,53	300,03	294,41	298,46	296,55	303,52	302,94	305,48
DS	2,92	7,07	7,72	6,70	5,66	5,94	6,37	7,42
CV%	0,94	2,36	2,62	2,24	1,91	1,96	2,10	2,43
Mediana	309,46	301,85	294,79	299,83	296,55	303,13	305,13	305,20

**Figura 80. Evolución del Índice de Lee de los animales inducidos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.** A. Evolución del Índice de Lee  $[(\text{peso corporal -g-})^{1/3}/\text{longitud naso-anal -mm-}] \times 10000$  a lo largo del tiempo. B. Índice de Lee en cada una de las edades estudiadas. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido. n: número de efectivos; DE: desviación estándar; CV%: Coeficiente de variación %.

Por otra parte, el Índice de Masa Corporal también fue mayor en los grupos de dietas hiperlipídicas pero las diferencias sólo fueron significativas para el grupo de aceite de oliva (Figura 81 A, B).

**B.**

Tiempo (días)	52	53,5	54	55	58	63	100	150
<b>Ci</b>								
n	5	10	10	10	10	10	10	10
Media	0,55	0,54	0,54	0,49	0,53	0,54	0,59	0,60
DS	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04
CV%	5,06	7,66	7,39	7,20	6,30	5,59	3,37	6,43
Mediana	0,54	0,54	0,55	0,49	0,53	0,53	0,59	0,59
<b>Mi</b>								
n	5	10	10	10	10	10	10	10
Media	0,56	0,54	0,53	0,51	0,54	0,55	0,58	0,63
DS	0,04	0,04	0,03	0,07	0,04	0,03	0,02	0,03
CV%	6,34	8,27	5,98	13,38	6,50	6,01	4,27	4,52
Mediana	0,58	0,55	0,53	0,53	0,53	0,55	0,58	0,64
<b>Oi</b>								
n	5	10	10	10	10	9	10	9
Media	0,57	0,54	0,52	0,52	0,54	0,57	0,60	0,62
DS	0,03	0,03	0,04	0,02	0,04	0,04	0,03	0,05
CV%	4,59	5,88	7,24	4,59	6,55	6,76	5,10	7,33
Mediana	0,57	0,54	0,52	0,53	0,53	0,57	0,60	0,63

**Figura 81. Evolución del Índice de Masa Corporal de los animales inducidos de los diferentes grupos experimentales a lo largo del tiempo.** A. Evolución del Índice de Masa Corporal (peso corporal -g-/longitud naso-anal<sup>2</sup> -cm<sup>2</sup>-) a lo largo del tiempo. B: Índice de Masa Corporal en cada una de las edades estudiadas. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido. N: número de efectivos; DE: desviación estándar; CV%: Coeficiente de variación %.

## **3.2. DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA**

La defensa antioxidante enzimática se estudió mediante el análisis de la expresión y la actividad hepáticas de las enzimas CAT, SOD GPX y GR, así como de la expresión de dichas enzimas en glándula mamaria. En hígado también se exploró el posible papel de NRF2.

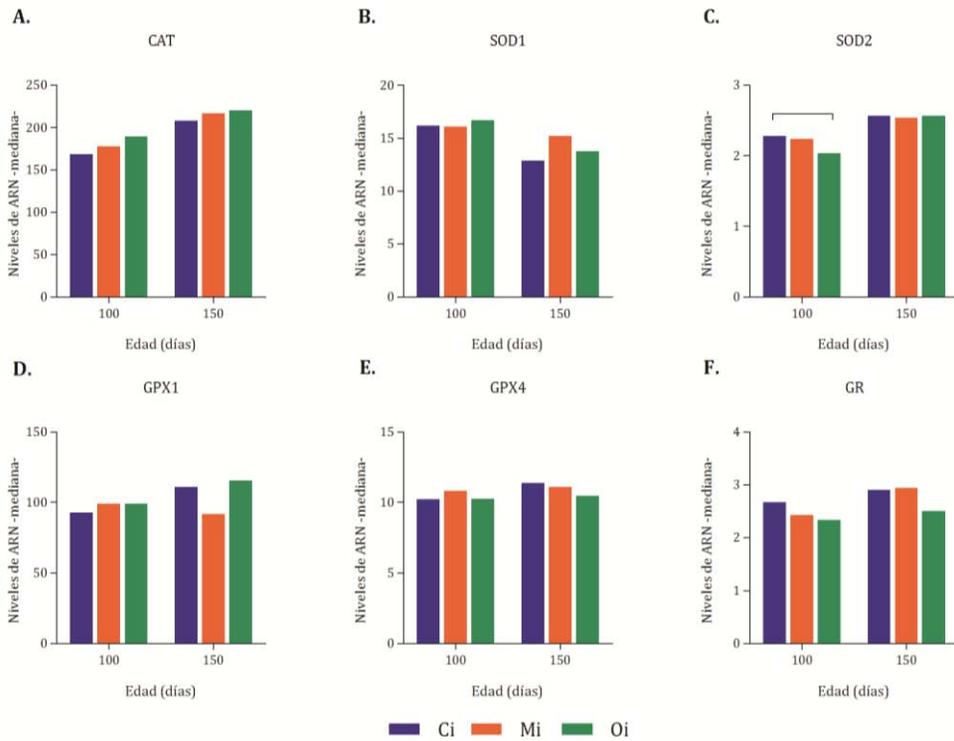
### **3.2.1. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO**

#### **3.2.1.1. Expresión génica**

Respecto a las diferencias encontradas en los niveles de expresión de CAT, SOD1, SOD2, GPX1, GPX4 y GR para una misma dieta entre las dos edades adultas analizadas (Figura 82), el grupo de dieta de aceite de maíz mostró un aumento significativo de los niveles de expresión de CAT, SOD2 y GR a 150 días respecto a 100 días. En los grupos de oliva y control no se hallaron diferencias (Figura 82 A, C, F y Tabla 11).

El análisis de las diferencias entre los distintos grupos experimentales para una misma edad mostró, en general, menores diferencias en los niveles de expresión en la etapa adulta que en la de la iniciación de la carcinogénesis (Figura 82 y apartado 2.1.1.1.). Ello ya sucedió en estas mismas edades en los animales sanos (Apartado 1.2.1.2.1). Así, la única diferencia significativa hallada fue la menor expresión hepática de SOD2 en el grupo de aceite de oliva respecto al control a los 100 días de edad (Figura 82 C).

Por otro lado se halló una correlación positiva y significativa entre los niveles de SOD1 y SOD2 a 150 días en el grupo de aceite de maíz (Anexo Tabla 22).



**G.**

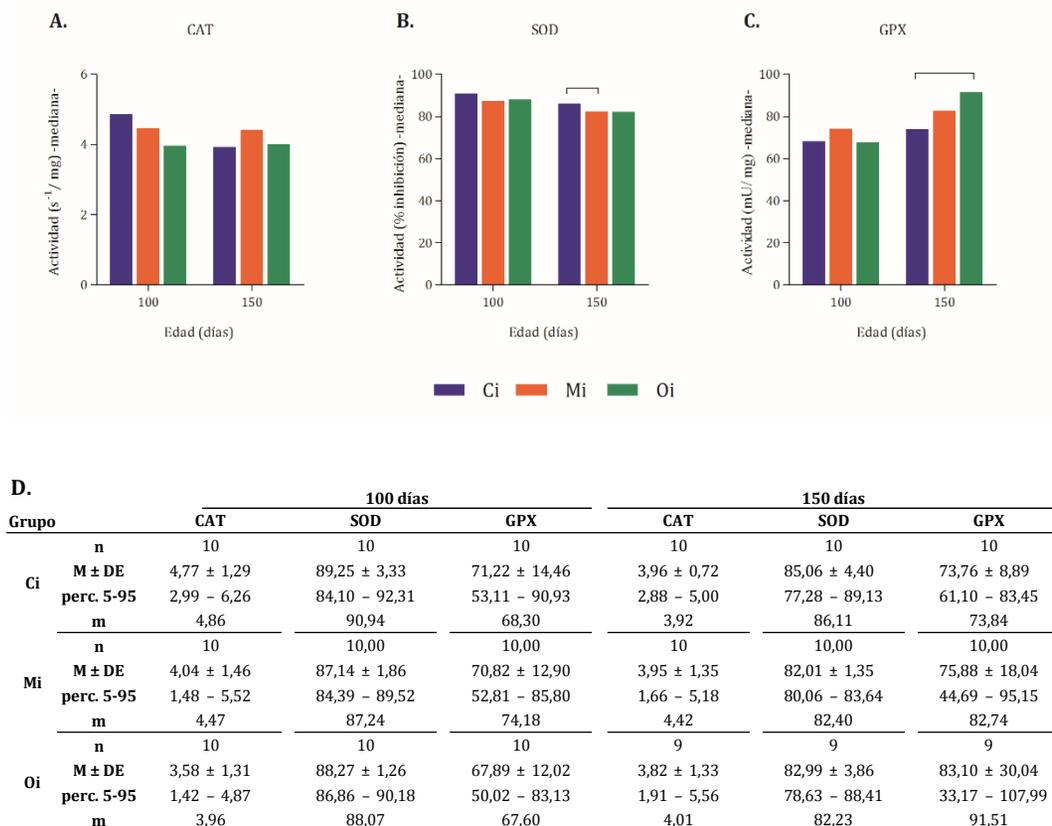
Edad	Grupo		SOD1	SOD2	CAT	GPX1	GPX4	GR	
100	Ci	n	10	10	10	10	10	10	
		M ± DE	17,00 ± 6,34	2,43 ± 0,36	185,06 ± 52,02	95,02 ± 14,84	10,32 ± 1,38	2,65 ± 0,47	
		perc. 5-95	10,18 - 27,72	2,08 - 2,97	134,44 - 271,33	76,84 - 118,13	8,45 - 12,38	2,01 - 3,25	
	Mi	m	16,16	2,28	168,20	92,70	10,21	2,67	
		n	10	10,00	10,00	10	10,00	10,00	
		M ± DE	18,66 ± 7,04	2,25 ± 0,30	181,63 ± 35,53	97,45 ± 14,52	10,73 ± 0,87	2,40 ± 0,32	
	Oi	perc. 5-95	14,20 - 31,31	1,95 - 2,69	143,65 - 237,54	75,40 - 116,33	9,65 - 11,93	1,91 - 2,75	
		m	16,09	2,24	178,04	99,10	10,82	2,42	
		n	10	10	10	10	10	10	
	150	Ci	M ± DE	17,44 ± 5,88	2,04 ± 0,21	197,38 ± 38,58	103,81 ± 17,36	9,91 ± 1,42	2,36 ± 0,26
			perc. 5-95	10,13 - 27,10	1,71 - 2,29	153,20 - 262,44	85,32 - 131,15	7,72 - 11,54	1,98 - 2,64
			m	16,70	2,04	189,73	98,94	10,26	2,33
Mi		n	10	10	10	10	10	10	
		M ± DE	15,12 ± 6,05	2,80 ± 0,59	225,53 ± 64,95	106,92 ± 25,68	11,35 ± 1,63	3,03 ± 0,42	
		perc. 5-95	10,05 - 25,30	2,20 - 3,69	149,58 - 326,30	75,23 - 143,02	9,32 - 13,42	2,52 - 3,59	
Oi		m	12,86	2,57	207,82	110,92	11,39	2,90	
		n	10	10	10	10	10	10	
		M ± DE	15,30 ± 4,95	2,68 ± 0,44	219,63 ± 24,20	91,77 ± 14,35	11,04 ± 0,54	3,05 ± 0,54	
Mi		perc. 5-95	9,91 - 21,19	2,13 - 3,33	190,56 - 255,50	70,62 - 108,88	10,34 - 11,86	2,53 - 3,94	
		m	15,21	2,54	216,87	91,80	11,07	2,94	
		n	9	9	9	9	9	9	
Oi	M ± DE	15,21 ± 4,70	2,68 ± 0,98	207,95 ± 80,72	105,76 ± 41,29	9,89 ± 1,37	2,58 ± 0,57		
	perc. 5-95	10,31 - 22,44	1,85 - 4,33	94,85 - 314,42	41,81 - 142,53	7,81 - 11,37	1,90 - 3,42		
	m	13,77	2,57	220,25	115,29	10,46	2,50		

**Figura 82. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de las enzimas CAT (A), SOD1 (B), SOD2 (C), GPX1 (D), GPX4 (E) y GR (F) en hígado de animales adultos previamente inducidos con DMBA. G: Parámetros estadísticos. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; —: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.**

## Resultados

### 3.2.1.2. Actividad enzimática

Al analizar los niveles de actividad enzimática entre las dos edades para un mismo grupo experimental se observó que la actividad CAT se mantuvo sin cambios, mientras que la actividad SOD disminuyó a 150 días en todos los grupos experimentales. Respecto a la actividad GPX, sus niveles no variaron en los grupos de aceite de maíz y control, mientras que en el grupo de aceite de oliva aumentó sus niveles a 150 días respecto a 100 días (Figura 83 A, B, C, D y Tabla 11).



**Figura 83. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de actividad de las enzimas CAT (A), SOD (B), GPX (C), en hígado de animales adultos previamente inducidos con DMBA. D. Parámetros estadísticos. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; ---: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.**

Por otra parte, no se hallaron diferencias entre los grupos experimentales en la actividad CAT. En cambio, a 150 días el grupo de aceite de maíz mostró unos niveles inferiores de actividad SOD respecto al control y el grupo de aceite de oliva unos niveles superiores de actividad GPX respecto a la dieta control (Figura 83 A, B, C).

Por otro lado se hallaron correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre la expresión de SOD2 y la actividad SOD a 150 días de edad en el grupo de aceite de maíz y entre la expresión de SOD1 y la actividad SOD a 100 días en el grupo de aceite de oliva y a 150 días en los grupos de dietas hiperlipídicas (Anexo Tabla 22) y entre la expresión de GPX1 la actividad GPX a 150 días en los grupos de aceite de maíz y de aceite de oliva (Anexo Tabla 23).

### 3.2.1.3. Regulación de la expresión génica

Al igual que en los bloques anteriores de resultados, se determinaron los niveles totales del factor de transcripción NRF2 así como de su retención en citoplasma.

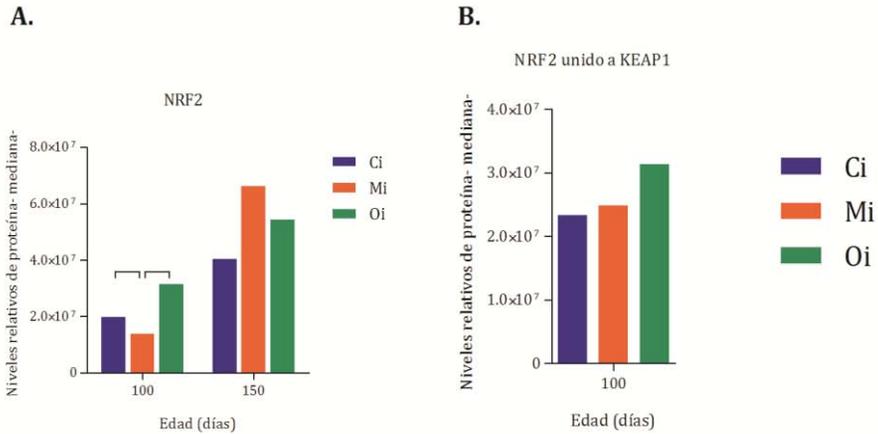
- **NRF2 total y retención citoplasmática de NRF2.**

Los niveles de NRF2 total aumentaron significativamente a 150 días respecto a 100 días independientemente del grupo experimental (Figura 84 A, C y Tabla 11).

Además, se observaron diferencias entre grupos de manera que dichos niveles a día 100 fueron menores en el grupo de aceite de maíz respecto a los otros dos. Sin embargo, a día 150 no se observaron diferencias entre grupos experimentales (Figura 84 A).

A 100 días también se analizaron los niveles de NRF2 unido a KEAP1, no obteniéndose diferencias en función de la dieta administrada (Figura 84 B).

Por otro lado no se hallaron correlaciones significativas entre los niveles de NRF2 total y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR (Anexo Tabla 24).



C. Grupo	100 días		150 días	
	NRF2 total	NRF2-KEAP1	NRF2 total	
Ci	n	10	10	
	M ± DE	2,40E+07 ± 8,21E+06	2,65E+07 ± 1,49E+07	2,94E+08 ± 3,57E+08
	perc. 5-95	1,46E+07 - 3,65E+07	1,16E+07 - 5,12E+07	2,03E+07 - 8,01E+08
	m	2,30E+07	2,33E+07	2,74E+07
Mi	n	10	10	
	M ± DE	2,58E+08 ± 2,77E+08	3,22E+07 ± 2,64E+07	3,11E+08 ± 2,43E+08
	perc. 5-95	1,66E+07 - 6,57E+08	6,07E+06 - 7,40E+07	5,79E+07 - 6,32E+08
	m	1,36E+08	2,49E+07	2,88E+08
Oi	n	10	9	
	M ± DE	3,79E+08 ± 3,95E+08	3,06E+07 ± 2,87E+07	5,77E+07 ± 2,52E+07
	perc. 5-95	2,05E+07 - 8,96E+08	1,49E+06 - 7,00E+07	2,99E+07 - 9,44E+07
	m	2,14E+08	3,13E+07	5,45E+07

**Figura 84. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles relativos de A. proteína NRF2 y B. retención citoplasmática de NRF2 en hígado de animales previamente inducidos con DMBA; C: Parámetros estadísticos. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{\text{---}}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.**

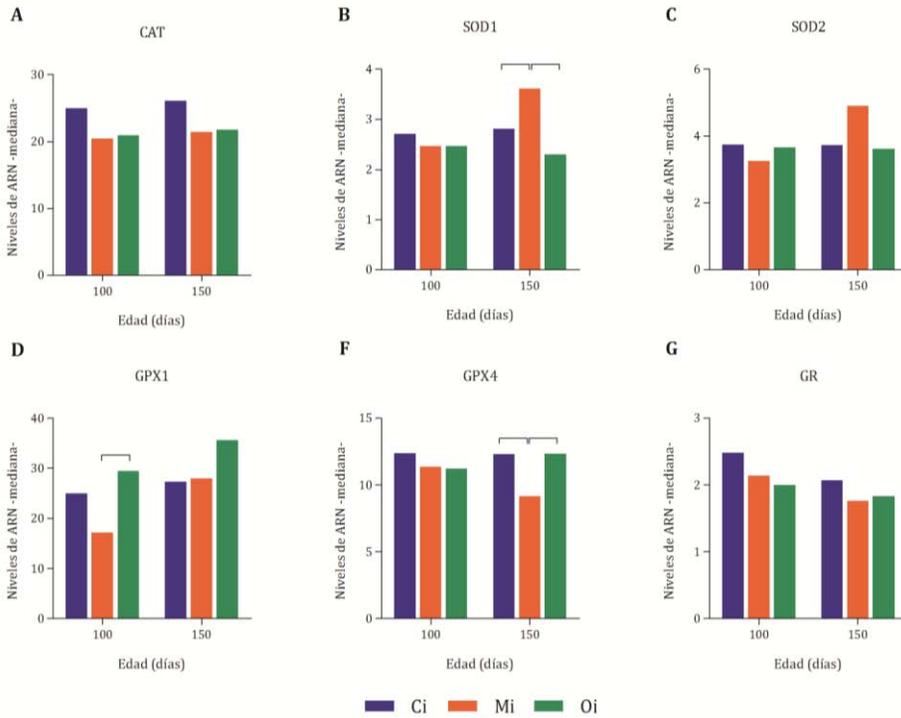
### 3.2.2. EXPRESIÓN ANTIOXIDANTE EN GLÁNDULA MAMARIA

Al comparar los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes en la glándula mamaria entre las dos edades en un mismo grupo experimental, se observó que dichos niveles generalmente no variaban. Únicamente, la enzima SOD1 aumentó su expresión en el grupo de aceite de maíz a 150 días (Figura 85 y Tabla 11).

Al analizar las diferencias entre grupos experimentales, los resultados mostraron que la expresión de las enzimas CAT, SOD2 y GR no varió significativamente (Figura 85 A, C, G). En cambio, el grupo de aceite de maíz a 150 días mostró un aumento de la expresión de SOD1 y una disminución de la de GPX4 en comparación con los otros grupos experimentales (Figura 85 B, E). El grupo de aceite de oliva mostró un aumento significativo de los niveles de expresión de GPX1 respecto al grupo de aceite de maíz a 100 días (Figura 85 D). A pesar de la tendencia en los grupos de dietas hiperlipídicas a presentar unos niveles de expresión de CAT inferiores a los del grupo control, las diferencias no fueron significativas (Figura 85 A).

Al correlacionar los niveles de expresión de cada enzima en glándula mamaria con los obtenidos en hígado, se observó una correlación positiva y significativa en SOD1 y GR a 150 días en el grupo control, en SOD2 y GPX4 a 100 días en el grupo de aceite de oliva. Además se halló una correlación negativa significativa entre las expresiones de SOD1 a 150 días en el grupo de aceite de oliva (Anexo Tabla 25). Por otro lado se halló una correlación positiva y significativa entre las expresiones de SOD1 y SOD2 en glándula mamaria a 150 días en el grupo de aceite de maíz (Anexo Tabla 26) y entre las expresiones de GPX1 y GPX4 a 100 días en todos los grupos experimentales (Anexo Tabla 27).

## Resultados



### G.

Edad	Grupo		SOD1	SOD2	CAT	GPX1	GPX4	GR
100	Ci	n	10	10	10	10	10	10
		M ± DE	25,25 ± 6,30	2,70 ± 0,94	3,90 ± 1,21	28,94 ± 16,36	13,28 ± 4,10	2,60 ± 0,58
		perc. 5-95	17,43 - 34,90	1,40 - 3,92	2,58 - 5,81	13,62 - 57,50	9,27 - 20,19	1,90 - 3,55
	Mi	m	25,01	2,71	3,74	25,02	12,36	2,48
		n	10	10,00	10,00	10	10,00	10,00
		M ± DE	20,02 ± 5,11	2,51 ± 0,55	3,21 ± 1,23	20,48 ± 8,53	11,39 ± 3,59	2,08 ± 0,56
	Oi	perc. 5-95	12,50 - 26,88	1,94 - 3,32	1,49 - 4,69	11,38 - 33,92	6,77 - 16,59	1,29 - 2,80
		m	20,46	2,47	3,25	17,16	11,37	2,14
		n	10	10	10	10	10	10
	Ci	M ± DE	23,38 ± 9,62	2,42 ± 0,55	4,13 ± 2,13	29,77 ± 9,60	12,58 ± 3,72	2,27 ± 0,73
		perc. 5-95	12,63 - 39,24	1,75 - 3,18	2,79 - 7,34	17,10 - 41,48	9,10 - 18,70	1,44 - 3,41
		m	20,97	2,47	3,66	29,42	11,23	2,00
	Mi	n	10	10	10	10	10	10
		M ± DE	26,68 ± 13,67	2,91 ± 0,68	4,51 ± 1,88	28,56 ± 15,76	11,73 ± 3,37	2,26 ± 1,03
		perc. 5-95	7,77 - 47,32	2,12 - 3,81	2,49 - 7,43	8,59 - 52,93	6,96 - 15,45	1,08 - 3,80
	Oi	m	26,06	2,81	3,72	27,27	12,30	2,07
		n	10	10	10	10	10	10
		M ± DE	20,53 ± 10,35	4,08 ± 1,86	5,16 ± 2,71	28,07 ± 8,27	9,31 ± 3,68	1,70 ± 0,81
Ci	perc. 5-95	7,22 - 35,27	1,97 - 7,10	1,45 - 9,41	17,48 - 39,14	4,26 - 14,56	0,68 - 2,84	
	m	21,47	3,61	4,89	27,97	9,18	1,76	
	n	9	9	9	9	9	9	
Mi	M ± DE	22,83 ± 8,23	2,35 ± 0,65	4,02 ± 1,74	34,03 ± 15,07	13,43 ± 3,27	2,16 ± 0,85	
	perc. 5-95	11,06 - 32,49	1,44 - 3,25	1,79 - 6,60	16,24 - 54,31	10,37 - 18,33	1,29 - 3,32	
	m	21,77	2,30	3,61	35,55	12,32	1,83	
Oi	n	9	9	9	9	9	9	
	M ± DE	22,83 ± 8,23	2,35 ± 0,65	4,02 ± 1,74	34,03 ± 15,07	13,43 ± 3,27	2,16 ± 0,85	
	perc. 5-95	11,06 - 32,49	1,44 - 3,25	1,79 - 6,60	16,24 - 54,31	10,37 - 18,33	1,29 - 3,32	
Ci	m	21,77	2,30	3,61	35,55	12,32	1,83	
	n	9	9	9	9	9	9	
	M ± DE	22,83 ± 8,23	2,35 ± 0,65	4,02 ± 1,74	34,03 ± 15,07	13,43 ± 3,27	2,16 ± 0,85	
Mi	perc. 5-95	11,06 - 32,49	1,44 - 3,25	1,79 - 6,60	16,24 - 54,31	10,37 - 18,33	1,29 - 3,32	
	m	21,77	2,30	3,61	35,55	12,32	1,83	
	n	9	9	9	9	9	9	
Oi	M ± DE	22,83 ± 8,23	2,35 ± 0,65	4,02 ± 1,74	34,03 ± 15,07	13,43 ± 3,27	2,16 ± 0,85	
	perc. 5-95	11,06 - 32,49	1,44 - 3,25	1,79 - 6,60	16,24 - 54,31	10,37 - 18,33	1,29 - 3,32	
	m	21,77	2,30	3,61	35,55	12,32	1,83	

**Figura 85. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de las enzimas CAT (A), SOD1 (B), SOD2 (C), GPX1 (D), GPX4 (E) y GR (F) en glándula mamaria de animales adultos previamente inducidos con DMBA. G: Parámetros estadísticos. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido; ---: p < 0.05; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.**

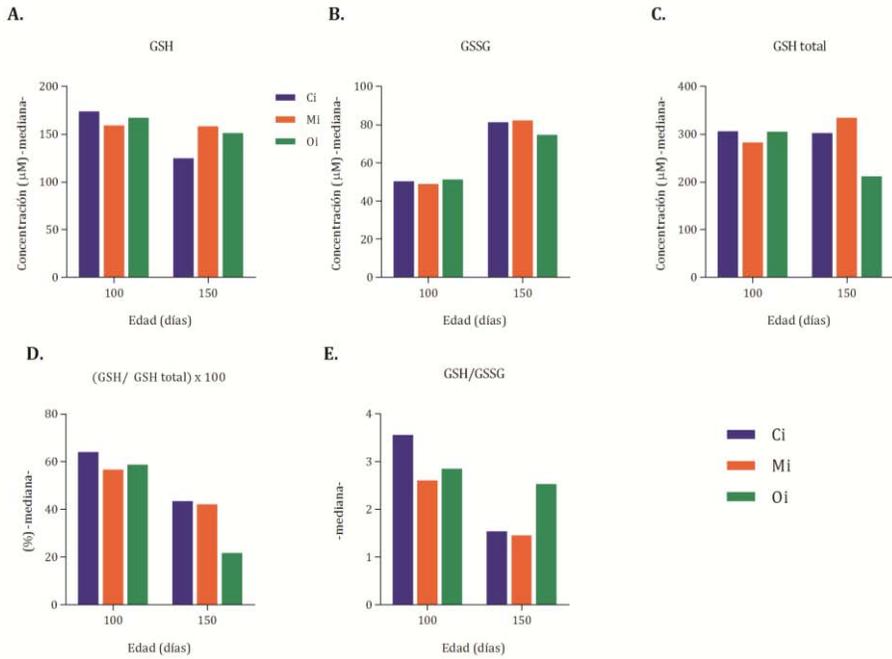
### **3.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA. NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUTATIÓN**

Al analizar los diversos parámetros relacionados con el glutatión, se observaron cambios significativos para un mismo grupo experimental al comparar las dos edades analizadas. Así, mientras que los niveles de GSH se mantuvieron sin cambios, en todos los grupos experimentales los niveles de GSSG aumentaron a 150 días, a la vez que disminuyeron las ratios de GSH/GSH total y GSH/GSSG. Además, en el grupo de aceite de maíz los niveles de GSH total también aumentaron a 150 días (Figura 86 y Tabla 11).

Los resultados no mostraron diferencias entre grupos experimentales en ninguno de los parámetros relacionados con el glutatión (Figura 86).

Por otro lado se obtuvieron correlaciones positivas significativas entre los niveles de GSH y GSH total a 100 y 150 días en todos los grupos experimentales; entre los niveles de GSH y GSSG a 100 días en el grupo control; entre GSSG y GSH total a 100 días en los grupos control y de aceite de maíz, y a 150 días en el grupo de aceite de oliva; entre los niveles de GSSG y la ratio GSH/GSSG a 100 días en los grupos control y de aceite de maíz; y entre los niveles de GSH y la ratio GSH/GSSG a 150 días en todos los grupos experimentales (Anexo Tabla 28). Además se halló una correlación positiva significativa entre los niveles de GSSG y la actividad GPX a 100 días en el grupo de aceite de oliva (Anexo Tabla 29).

# Resultados



## F.

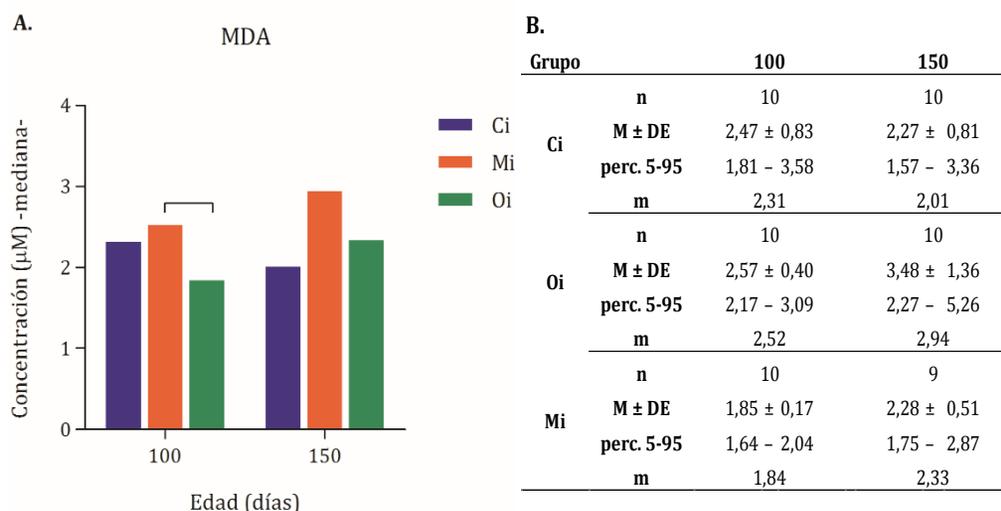
Edad (días)	Grupo		GSH	GSH total	GSSG	GSH/ GSH total	GSH/ GSSG
100	Ci	n	10	10	10	10	10
		M $\pm$ DE	175,08 <sup>↙</sup> 49,64	280,04 <sup>↙</sup> 78,55	52,48 <sup>↙</sup> 18,64	62,86 $\pm$ 5,83	3,50 $\pm$ 0,81
		perc. 5-95	107,08 <sup>↙</sup> 241,42	164,75 <sup>↙</sup> 370,56	28,84 <sup>↙</sup> 78,22	52,93 - 69,73	2,25 - 4,62
		m	173,91	306,04	50,23	639,88	35,54
	Mi	n	10	10	10	10	10,00
		M $\pm$ DE	165,60 <sup>↙</sup> 44,40	276,00 <sup>↙</sup> 53,79	55,20 <sup>↙</sup> 13,44	59,57 $\pm$ 7,69	3,13 $\pm$ 1,08
		perc. 5-95	117,89 <sup>↙</sup> 226,23	208,48 <sup>↙</sup> 338,89	42,94 <sup>↙</sup> 77,08	50,49 - 70,76	2,05 - 4,84
		m	158,96	282,30	48,94	56,56	2,61
	Oi	n	10	10	10	10	10
		M $\pm$ DE	165,17 <sup>↙</sup> 45,82	273,04 <sup>↙</sup> 60,77	53,94 <sup>↙</sup> 14,44	60,24 $\pm$ 6,79	3,18 $\pm$ 1,00
		perc. 5-95	109,31 <sup>↙</sup> 227,79	178,85 <sup>↙</sup> 329,32	34,77 <sup>↙</sup> 75,35	52,57 - 70,68	2,22 - 4,84
		m	166,97	304,59	51,28	58,68	2,85
150	Ci	n	10	10	10	10	10
		M $\pm$ DE	144,32 <sup>↙</sup> 42,97	307,78 <sup>↙</sup> 47,39	81,73 <sup>↙</sup> 6,90	46,06 $\pm$ 7,07	1,77 $\pm$ 0,52
		perc. 5-95	102,05 <sup>↙</sup> 201,83	252,95 <sup>↙</sup> 368,49	71,92 <sup>↙</sup> 91,13	39,02 - 55,38	1,28 - 2,49
		m	124,69	301,81	81,22	43,44	1,54
	Mi	n	10	10	10	10	10
		M $\pm$ DE	158,52 <sup>↙</sup> 47,49	321,96 <sup>↙</sup> 59,89	81,72 <sup>↙</sup> 16,62	48,64 $\pm$ 8,53	1,99 $\pm$ 0,66
		perc. 5-95	94,98 <sup>↙</sup> 223,25	227,08 <sup>↙</sup> 392,32	63,61 <sup>↙</sup> 107,11	38,71 - 57,91	1,27 - 2,76
		m	160,61	332,39	78,48	48,82	1,98
	Oi	n	10	10	10	9	9
		M $\pm$ DE	153,37 <sup>↙</sup> 48,13	304,69 <sup>↙</sup> 61,06	75,66 <sup>↙</sup> 22,35	50,08 $\pm$ 10,29	2,14 $\pm$ 0,74
		perc. 5-95	94,66 <sup>↙</sup> 208,77	209,23 <sup>↙</sup> 363,12	55,94 <sup>↙</sup> 111,14	33,73 - 59,10	1,04 - 2,89
		m	163,31	318,82	73,26	55,83	2,53

**Figura 86. Efectos de los lípidos de la dieta sobre la concentración de GSH ( $\mu\text{M}$ ) (A), GSSG ( $\mu\text{M}$ ) (B); GSH total ( $\mu\text{M}$ ) (C); y las ratios GSH/GSH total (D), GSH/GSSG (E) en plasma en animales adultos previamente inducidos. F. Parámetros estadísticos. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\leftarrow$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.**

### 3.4. DAÑO OXIDATIVO EN MACROMOLÉCULAS

#### 3.4.1. DAÑO OXIDATIVO EN LÍPIDOS. NIVELES PLASMÁTICOS DE MDA

Los resultados del análisis de los niveles plasmáticos de MDA mostraron una tendencia por parte del grupo de aceite de maíz a presentar unos niveles superiores a los de los otros dos grupos. Las diferencias fueron significativas sólo a 100 días entre dicho grupo y el de la dieta de aceite de oliva (Figura 87).



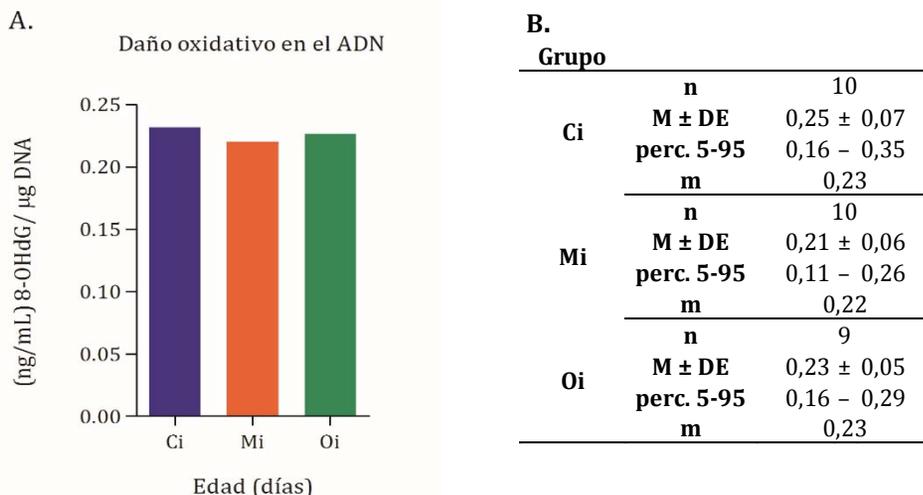
**Figura 87. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en plasma en animales adultos previamente inducidos.** A. Concentración. B. Parámetros estadísticos. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\text{---}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

#### 3.4.2. DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA. NIVELES DE 8-OHdG

El daño oxidativo en la glándula mamaria se determinó mediante la cuantificación de los niveles de la base modificada 8-OHdG al final del estudio (150 días). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Figura 88), a diferencia de lo ocurrido en la etapa de la iniciación (Figura 73).

## Resultados

No se hallaron correlaciones significativas entre los niveles de 8-OHdG en glándula mamaria y los de MDA en plasma (Anexo Tabla 30).

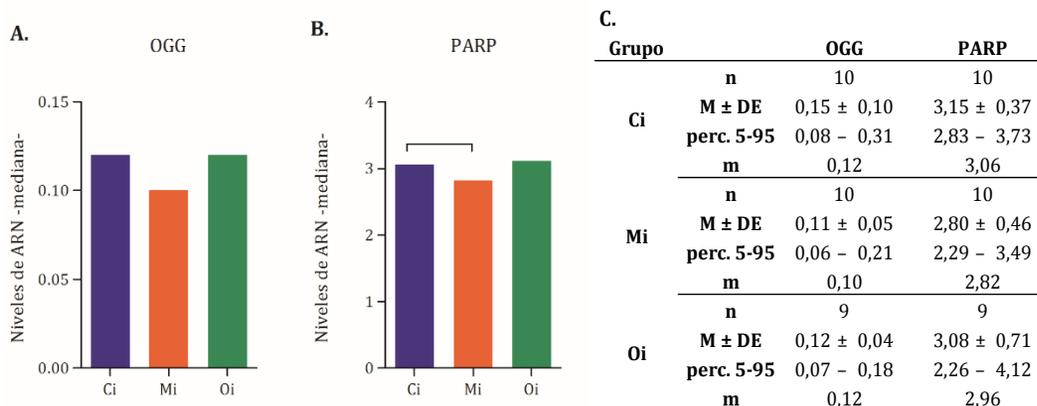


**Figura 88. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de 8-OHdG en glándula mamaria de animales adultos (150 días) previamente inducidos.** A. Niveles de 8-OHdG. B. Parámetros estadísticos. (ng/mL) 8-OHdG/µg ADN: unidades de 8-OHdG relativizadas a µg de ADN. Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

### 3.4.3. REPARACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN DE GLÁNDULA MAMARIA

Los resultados del análisis de la expresión de los genes de reparación OGG y PARP en glándula mamaria a 150 días mostraron que el grupo de aceite de maíz presentaba unos niveles de expresión inferiores respecto a los otros dos grupos (Figura 89). Las diferencias fueron significativas para la enzima de PARP entre el grupo de aceite de maíz y el control. El grupo de aceite de oliva mostró unos niveles de expresión de ambos genes similares a los del grupo control (Figura 89).

Por otro lado únicamente se halló una correlación positiva significativa entre los niveles de expresión de PARP y los de 8-OHdG en el grupo control (Anexo tabla 31).



**Figura 89. Efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles de expresión relativa de la enzima A. OGG y B. PARP en glándula de animales adultos (150 días) previamente inducidos. C. Parámetros estadísticos.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido;  $\overline{\text{---}}$ :  $p < 0.05$ ; test U de Mann Whitney. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana.

**Tabla 11. Efecto de los lípidos de la dieta sobre diferentes parámetros de estrés oxidativo en la carcinogénesis mamaria a entre 100 y 150 días de edad.**

100 días vs. 150 días										
Hígado										
Grupo	Expresión						Actividad			
	CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR	CAT	SOD	GPX	NRF2 total
Ci	,151	,450	,089	,406	,151	,082	,151	,023	,597	,000
Mi	,005	,450	,013	,450	,427	,007	,940	,000	,257	,002
Oi	,624	,414	,072	,683	,935	,414	,935	,005	,014	,003

100 días vs. 150 días												
Grupo	Glándula mamaria						Plasma					
	Expresión						GSH	GSSG	GSH total	GSH/ GSH total	GSH/ GSSG	MDA
	CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR						
Ci	,705	,545	,734	,940	,545	,290	,226	,001	,496	,001	,001	,602
Mi	,821	,005	,070	,070	,257	,199	,683	,002	,041	,018	,020	,251
Oi	,744	,744	,870	,594	,286	,424	,414	,014	,253	,041	,041	,175

Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido. p-valor < 0.05 (en rojo). Test estadístico de U de Mann Whitney.

### **3.5. CARCINOGENESIS MAMARIA EXPERIMENTAL**

Con el objetivo de estudiar la influencia de los lípidos de la dieta sobre la carcinogénesis mamaria se realizaron dos tipos de estudio. En primer lugar, un estudio morfológico de la glándula mamaria que consistió, por una parte, en el análisis del número de estructuras proliferativas epiteliales y, por otra, en el de su grado de densidad, ya que ésta está considerada como un factor de riesgo de cáncer de mama en humanos. En segundo lugar, se realizó el estudio completo de la evolución de la carcinogénesis mamaria a través del análisis de diversos parámetros clínicos.

#### **3.5.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.**

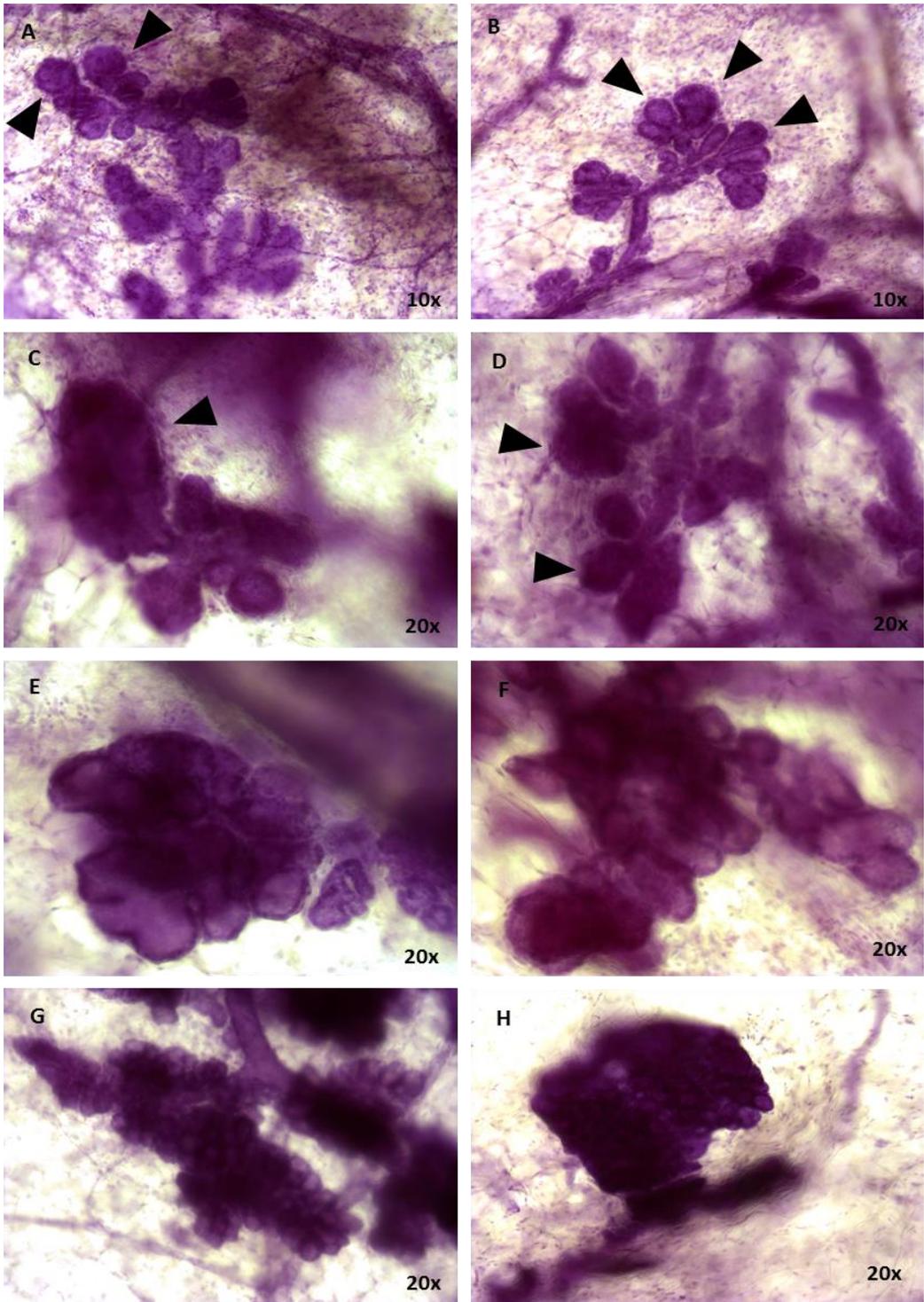
El estudio morfológico de la glándula mamaria se llevó a cabo en preparaciones *Whole Mount* de las glándulas abdominales de los animales de 100 días de edad.

##### **3.5.1.1. Estructuras proliferativas y epiteliales**

Se identificaron y cuantificaron las diferentes estructuras proliferativas del epitelio mamario: PIDL1, PIDL2, tumores e hiperplasias. (Figura 90).

En primer lugar, se caracterizó el perfil del tipo de estructuras que presentaba cada grupo experimental, y en segundo lugar se analizaron las diferencias en cada una de dichas estructuras entre los grupos experimentales. En ambos casos el análisis de los datos se efectuó considerando tanto la suma total de estructuras como el valor de la mediana.

aceite de maíz respecto a los otros dos grupos. No obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el resto de estructuras no se hallaron diferencias entre grupos (Figura 91 C, D).

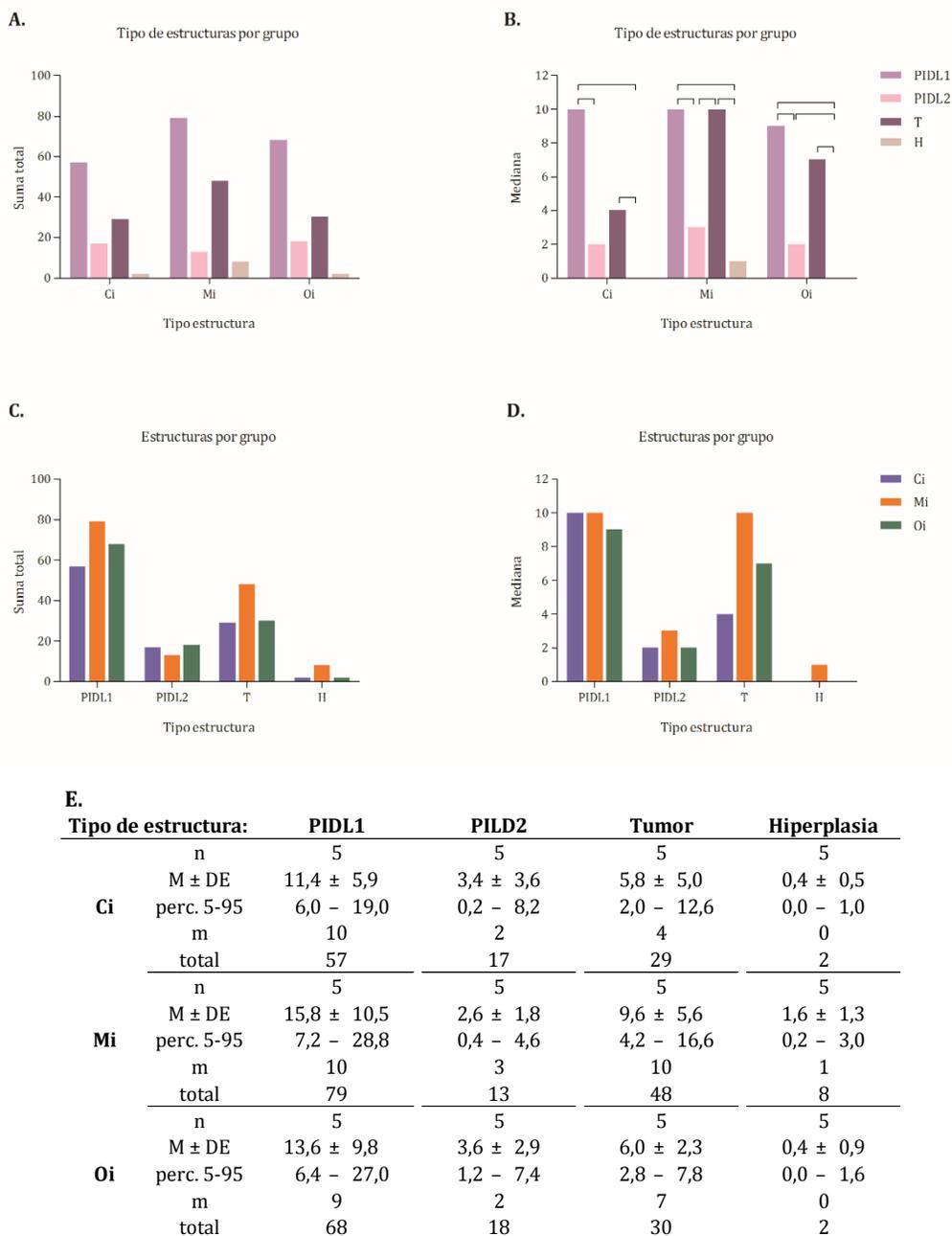


**Figura 90.** Imagen representativa de las diferentes estructuras en glándula mamaria de rata en animales adultos (100 días) previamente inducidos. A, B) PIDL1; C, D) PIDL2; E, F) Tumor; G, H) Hiperplasia.

## *Resultados*

Los resultados mostraron que en los tres grupos experimentales la estructura mayoritaria fueron los PIDL1, seguidos de los PIDL2, los tumores y, por último, las hiperplasias. El grupo de dieta de aceite de maíz presentó unos niveles significativamente más elevados de tumores que de PIDL2. Los grupos control y de aceite de oliva, al presentar un menor número de tumores, no mostraron diferencias significativas entre estas estructuras. En cambio, el grupo de aceite de oliva fue el único que mostró diferencias significativas entre el número de PIDL2 y el de hiperplasias. Por otra parte, todos los grupos experimentales mostraron diferencias entre los niveles de estructuras PIDL y de PIDL2, siendo minoritaria ésta última. Sin embargo, no se hallaron diferencias entre los niveles de PIDL1 y de tumores en ningún grupo experimental, ya que estos fueron muy similares. Además, todos los grupos experimentales mostraron una cantidad de hiperplasias inferior a la de tumores y de PIDL1 (Figura 91 A, B).

En segundo lugar, se comparó el tipo de estructuras epiteliales entre grupos experimentales, observándose un mayor número de tumores y de hiperplasias en el grupo de la dieta de aceite de maíz.

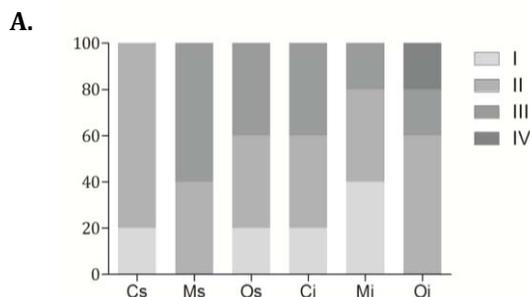


**Figura 91. Estructuras proliferativas epiteliales.** Sumatorio de estructuras de cada tipo en cada grupo experimental (A), Mediana del total de estructuras de cada tipo en cada grupo experimental (B), Sumatorio de estructuras en función del grupo experimental (C), Mediana del total de estructuras en función del grupo experimental (D). T: tumor; H: Hiperplasia; Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido. n: número de efectivos; M: media; DE: desviación estándar; perc. 5-95: percentiles 5 y 95; m: mediana; total: número total de estructuras.

### 3.5.1.2. Densidad de la glándula mamaria

Se realizó un estudio comparativo de la densidad de la glándula mamaria entre los diferentes grupos experimentales. Dicho estudio se basó en la categorización cualitativa de las glándulas mamarias en cuatro clases (I a IV, de menor a mayor densidad) y un análisis estadístico de los resultados mediante el test de ji-cuadrado.

Al analizar las diferencias entre los grupos de animales inducidos, se observó que el grupo de aceite de oliva no presentó ninguna glándula de clase I, mostrando en cambio un mayor número de glándulas de clase II; mientras que el grupo de aceite de maíz presentó generalmente glándulas de las clases I y II; y el grupo control presentó un mayor número de glándulas de clase II y III (Figura 92).



**B.**

Clase	I		II		III		IV	
	Nº de muestras	%						
<b>Grupo</b>								
<b>Ci</b>	1	20%	2	40%	2	40%	0	0%
<b>Mi</b>	2	40%	2	40%	1	20%	0	0%
<b>Oi</b>	0	0%	3	60%	1	20%	1	20%

Clase	I		II		III		IV	
	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%	Nº de muestras	%
<b>Grupo</b>								
<b>Cs</b>	1	20%	4	80%	0	0%	0	0%
<b>Ms</b>	0	0%	2	40%	3	60%	0	0%
<b>Os</b>	1	20%	2	40%	2	40%	0	0%

**Figura 92. Categorización cualitativa de la glándula mamaria en función de su grado de densidad estructural.** A) Representación gráfica. C) Número de muestras por clase en animales sanos e inducidos.

Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos en los animales sanos. En este caso, el grupo control presentó un mayor número de glándulas de clase II, mientras que los grupos de dietas hiperlipídicas mostraron un mayor número de glándulas de densidad mayor (clase II y III). Al analizar las diferencias entre los grupos de dietas hiperlipídicas se observó que mientras que el grupo de aceite de maíz no presentaba ninguna glándula de clase I, el grupo de aceite de oliva presentó un 20% de glándulas de dicha clase. Además, los dos grupos presentaron el mismo número de glándulas de clase II, pero el grupo de aceite de maíz presentó el 60% de clase III mientras que la dieta de aceite de oliva el 40% (Figura 92).

A pesar de las diferencias observadas, éstas no fueron estadísticamente significativas (Tabla 12).

**Tabla 12. Análisis estadístico del grado de densidad de la glándula mamaria en los diferentes grupos experimentales**

<b>Grupos comparados</b>	<b><math>\chi^2</math> Observada</b>	<b><math>\chi^2</math> Teórica</b>	<b>Significación</b>
<b>Cs/Ms</b>	4,67	5,99	NS
<b>Cs/Os</b>	2,67	5,99	NS
<b>Ms/Os</b>	1,2	5,99	NS
<b>Ci/Mi</b>	0,67	5,99	NS
<b>Ci/Oi</b>	2,53	7,81	NS
<b>Mi/Oi</b>	3,2	7,81	NS
<b>Cs/Ci</b>	2,67	5,99	NS
<b>Ms/Mi</b>	3	5,99	NS
<b>Os/Oi</b>	2,53	7,81	NS

$\chi^2$ : test de la Ji-cuadrado. NS: diferencias no significativas.

### 3.5.2. PARÁMETROS CLÍNICOS DE LA CARCINOGENESIS

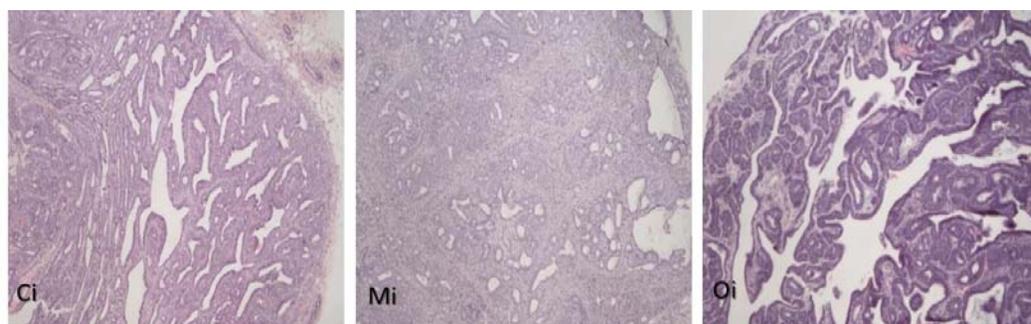
#### 3.5.2.1. Patología de las lesiones mamarias observadas. Clasificación histopatológica.

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

Tabla 13. Diagnóstico anatomopatológico de las muestras mamarias obtenidas al final del estudio.

	Ci	Mi	Oi
<b>PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA MALIGNA</b>			
<b>Adenocarcinomas</b>	<b>44</b>	<b>107</b>	<b>86</b>
<b>PATOLOGÍA NEOPLÁSICA MAMARIA BENIGNA</b>			
<b>Neoplásica</b>			
Adenoma	-	1	3
Fibroma	-	-	-
Fibroadenoma	2	9	3
Otras	2	-	2
<i>Papiloma</i>	-	-	-
<i>Lipoma</i>	-	-	-
<i>Fibrolipoma</i>	-	-	-
<i>Hemangioma</i>	-	-	-
<i>Linfangioma</i>	-	-	-
<b>Otras lesiones</b>			
Quísticas			
<i>Ductal</i>			
<i>Epidérmica</i>	1	1	3
No quísticas			
<i>Hiperplasia Lobulillar</i>	2	2	-
<i>Mastopatía</i>	-	-	-
<i>Fibrosis</i>	-	-	-

Las afecciones mamarias se clasificaron en función de los diferentes tipos histológicos como patología maligna y benigna. En el primer caso ésta consistió en el adenocarcinoma. Dentro de la patología mamaria benigna se consideraron diferentes tipos de lesiones, ya que algunas de ellas pueden evolucionar desfavorablemente. Por otra parte, cabe destacar que no se encontraron carcinomas escamosos (patología neoplásica mamaria no maligna) (Tabla 13).



**Figura 93. Imágenes histopatológicas representativas de los adenocarcinomas mamarios de los diferentes grupos experimentales.** Aumento 200X. Ci: grupo control inducido. Mi: grupo de aceite de maíz inducido. Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

### 3.5.2.2. Tiempo de latencia

El análisis del tiempo de latencia de los tumores se caracterizó de tres formas diferentes. En primer lugar, se consideró el **tiempo de aparición del primer tumor del grupo**. Así, en los tres grupos experimentales el primer tumor se detectó a los 28 días de la administración del carcinógeno (Tabla 14).

**Tabla 14. Tiempo de aparición del primer tumor en los diferentes grupos experimentales.**

t	28	28	28
N	3	3	3

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

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

$$L_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n t_i$$

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

## Resultados

**Tabla 15. Tiempo medio de latencia de los tumores de los diferentes grupos experimentales.**

	<u>Ci</u>	<u>Mi</u>	<u>Oi</u>
n	9	10	10
M	60	45	47
m	53	42,3	49,7
DE	12,5	10	15
CV	28,8	23,6	30,3

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

En este caso el grupo Mi presentó un tiempo medio de latencia inferior al del resto de los grupos, seguido del grupo Oi y finalmente del Ci (Tabla 15). Sin embargo, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (Tabla 17).

Finalmente, se analizó la distribución en el tiempo de los animales afectados dentro de un mismo grupo experimental, agrupando las palpaciones por **clases** en función del tiempo de la primera aparición de tumores mamarios malignos de cada rata (1 clase: 3 palpaciones) (Tabla 16). Los resultados no mostraron diferencias significativas (Tabla 17).

**Tabla 16. Distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

<b>Clases</b>	<b>I (P1-P3)</b>	<b>II (P4-P6)</b>	<b>III (P7-P9)</b>	<b>IV (P10-P12)</b>	<b>V (P13-P15)</b>
<b>Ci</b>	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	4 (40%)	0
<b>Mi</b>	2 (20%)	2 (20%)	5 (50%)	1 (10%)	0
<b>Oi</b>	2 (20%)	2 (20%)	5 (50%)	2 (20%)	0

P: palpación.

**Tabla 17. Análisis estadístico de la distribución por clases de la primera afectación de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.**

<b>Grupos comparados</b>	<b><math>\chi^2</math> Observada</b>	<b><math>\chi^2</math> Teórica</b>	<b>Significación</b>
<b>Ci vs. Mi</b>	3,38	9,49	NS
<b>Ci vs. Oi</b>	1,91	9,49	NS
<b>Mi vs. Oi</b>	0,67	9,49	NS

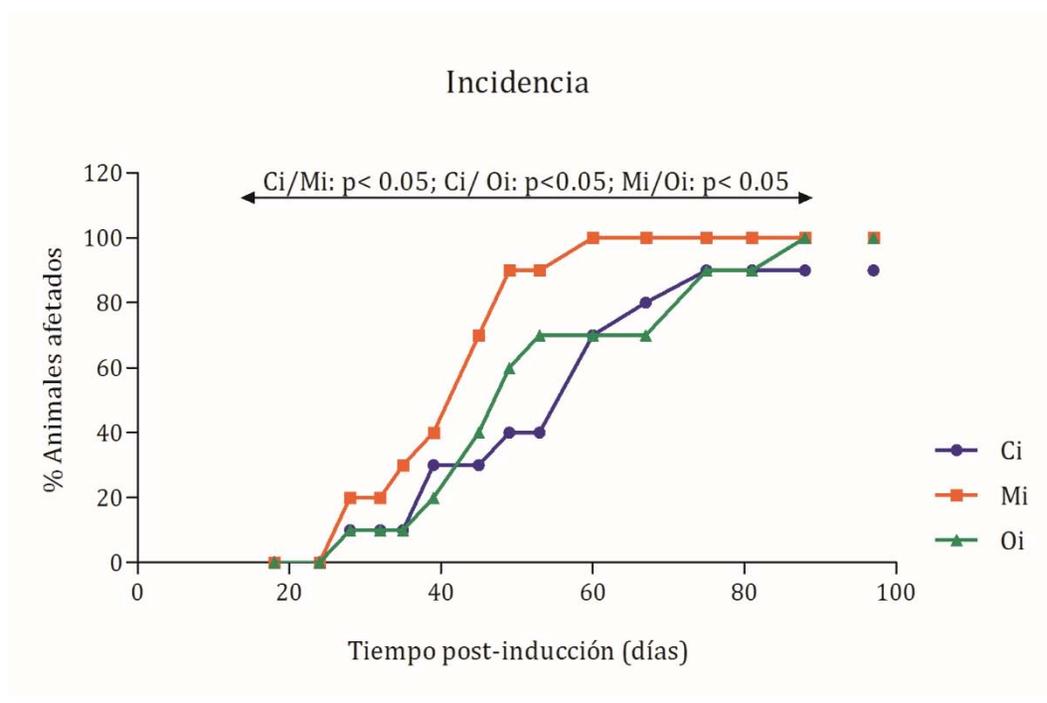
$\chi^2$ : test de la ji-cuadrado. ND: diferencias no significativas.

### 3.5.2.3. Incidencia

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

La incidencia de animales afectados aumentó durante todo el estudio en todos los grupos experimentales. Los valores del grupo Mi estuvieron por encima de los de los otros dos grupos durante prácticamente todo el estudio, siendo estadísticamente significativas las diferencias con ellos (Figura 94). El grupo Oi, por su parte, presentó valores de incidencia intermedios entre el grupo Mi y Ci, siendo también significativas las diferencias con el grupo Ci.

En el momento del sacrificio, los porcentajes de incidencia fueron los siguientes: Ci, 90% (9 animales de 10); Mi, 100% (10 animales de 10) y Oi, 100% (10 animales de 10).



**Figura 94. Incidencia de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

### 3.5.2.4. Contenido tumoral

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

#### 3.5.2.4.1. Contenido Tumoral Total ( $T_j$ )

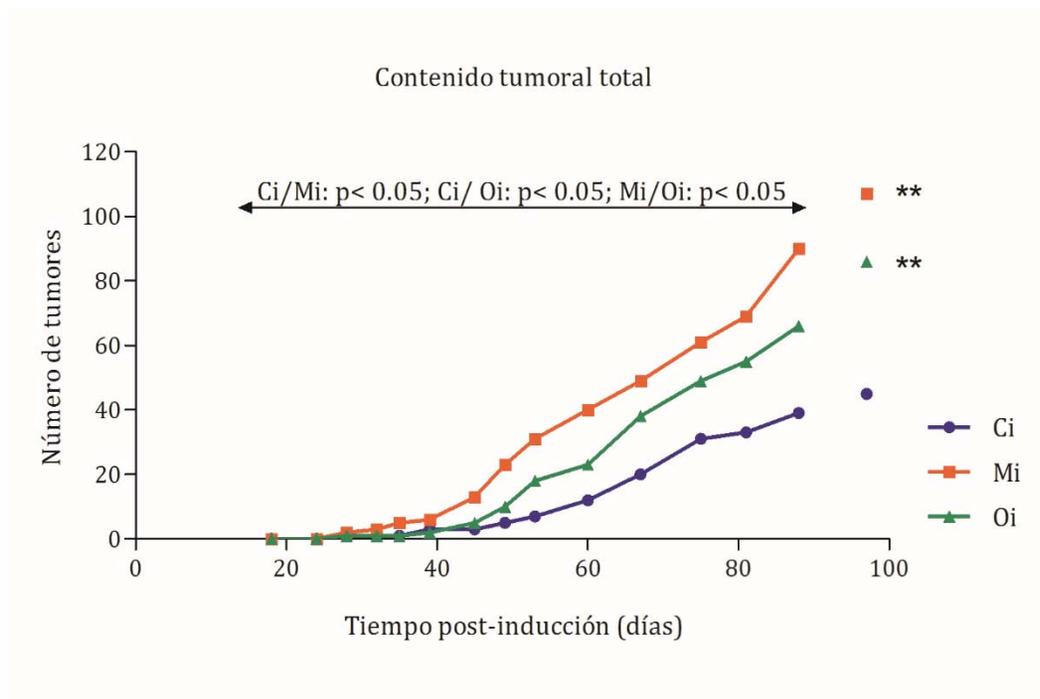
El contenido tumoral total se define como el número total de tumores por grupo experimental. La definición es la siguiente:

$$T_j = \sum_{i=1}^m K_i$$

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

El parámetro  $T$  puede tener el mismo valor en grupos con distinta incidencia, por lo que la información que proporciona es parcial. En consecuencia, a fin de realizar una aproximación lo más precisa posible, se estudió dicho parámetro junto con el contenido tumoral medio ( $K_j$ ) que se explicará a continuación.

El contenido tumoral total aumentó en todos los grupos a lo largo del ensayo, siendo el grupo  $M_i$  el que presentó un número total de tumores superior, seguido del grupo  $O_i$  y  $C_i$  (Figura 95). Las diferencias a lo largo del estudio fueron estadísticamente significativas para todas las comparaciones. Cabe destacar que no se observó la estabilización de este parámetro en ningún grupo experimental. Al final del estudio el número total de tumores obtenidos para cada grupo fue: 44 en  $C_i$ , 107 en  $M_i$  y 86 en  $O_i$ . Las diferencias entre  $C_i$  y los otros dos grupos fueron estadísticamente significativas.



**Figura 95. Contenido tumoral total de la patología mamaria maligna en los diferentes grupos experimentales.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido. \*\*  $p < 0.05$  vs. Ci en test de U de Mann Whitney.

### 3.5.2.4.2. Contenido Tumoral Medio ( $K_j$ )

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

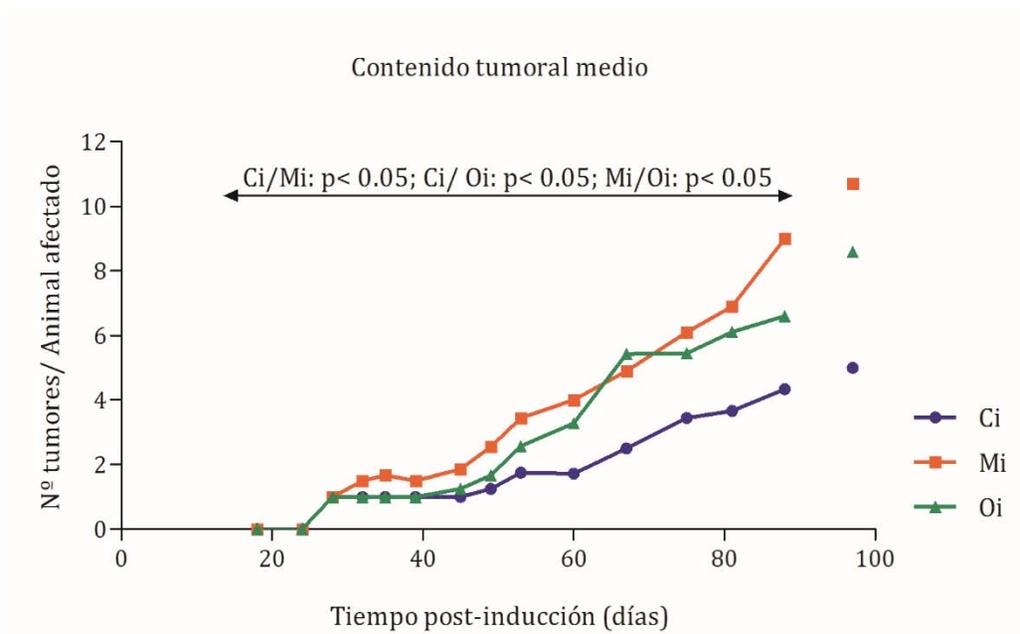
$$K_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n K_i$$

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

El valor medio  $K$  constituye un parámetro indicativo de la cantidad de tumores, respecto al tiempo, que podría esperarse que tuviera una rata que ha contraído la enfermedad cancerosa por el hecho de pertenecer a un grupo experimental determinado. Dicho parámetro presenta el inconveniente de estar afectado por la

## Resultados

dinámica de aparición de tumores en animales no afectados anteriormente y, por tanto, sufrir fluctuaciones importantes en las palpaciones. Por ese motivo, y por los expuestos anteriormente en el contenido tumoral total, se estudiaron ambos parámetros con el fin de tener una idea global del contenido tumoral.



**Figura 96. Contenido tumoral medio de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

El contenido tumoral medio también aumentó a lo largo de todo el estudio en todos los grupos experimentales. El grupo Mi presentó valores significativamente superiores a los de los otros dos grupos, mientras que el grupo Oi mostró una situación intermedia entre el grupo Mi y Ci, siendo significativas las diferencias con ambos (Figura 96). El grupo Ci presentó los valores más bajos. Por otra parte, las diferencias observadas al final del ensayo no fueron estadísticamente significativas.

### 3.5.2.5. Volumen tumoral

El análisis de la evolución del volumen tumoral a lo largo del tiempo permite hacer el seguimiento del crecimiento tumoral. El volumen tumoral se calculó a partir de los dos diámetros mayores ( $D_1$  y  $D_2$ ) de cada tumor, determinados durante las palpaciones, aplicando la fórmula del volumen del elipsoide de revolución.

$$V = \frac{4}{3}\pi \frac{D_1}{2} \left(\frac{D_2}{2}\right)^2 \quad (D_1 > D_2)$$

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

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

### 3.5.2.5.1. Volumen tumoral total ( $V$ )

La expresión matemática del volumen tumoral total es la siguiente:

Si  $K_a$  es el número de tumores de un animal  $a$ , el volumen tumoral total  $V$  ( $\text{cm}^3$ ) de ese animal vendrá expresado por:

$$V_a = \sum_{i=1}^{K_a} V_{1_i}$$

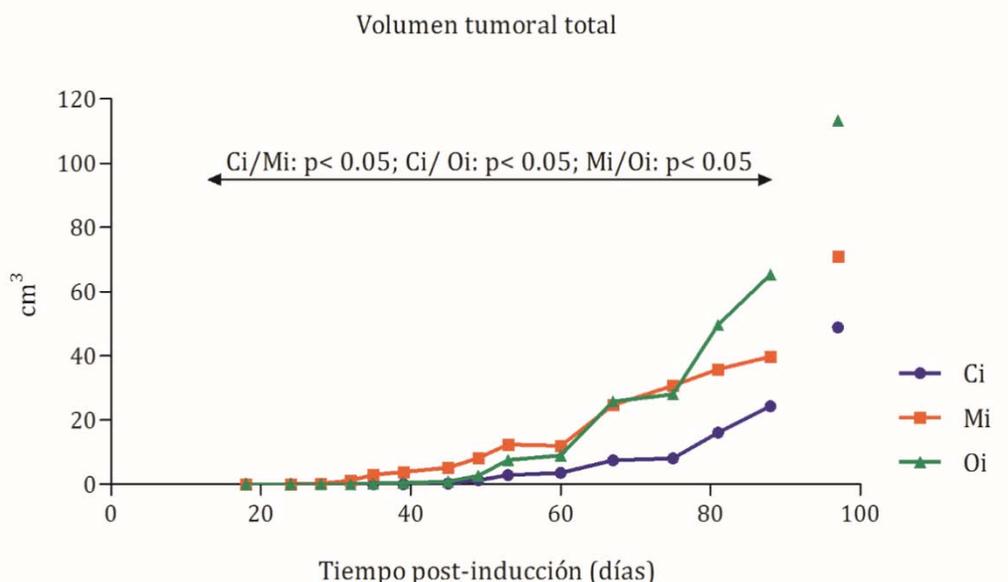
Si  $n$  es el número de ratas afectadas de un grupo experimental que existen en una palpación  $j$  del ensayo, el volumen tumoral total del grupo  $V_j$  se define como:

$$V_j = \sum_{a=1}^n V_a$$

En el momento del sacrificio no se puede analizar estadísticamente este parámetro porque sólo existe un dato por grupo. Sin embargo, la utilización de este

## Resultados

parámetro se justifica por el hecho de ser independiente de la incidencia y, por tanto, estar libre de oscilaciones debidas a los animales que debutan con tumores.



**Figura 97. Volumen tumoral total de la patología mamaria maligna en los diferentes grupos experimentales.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

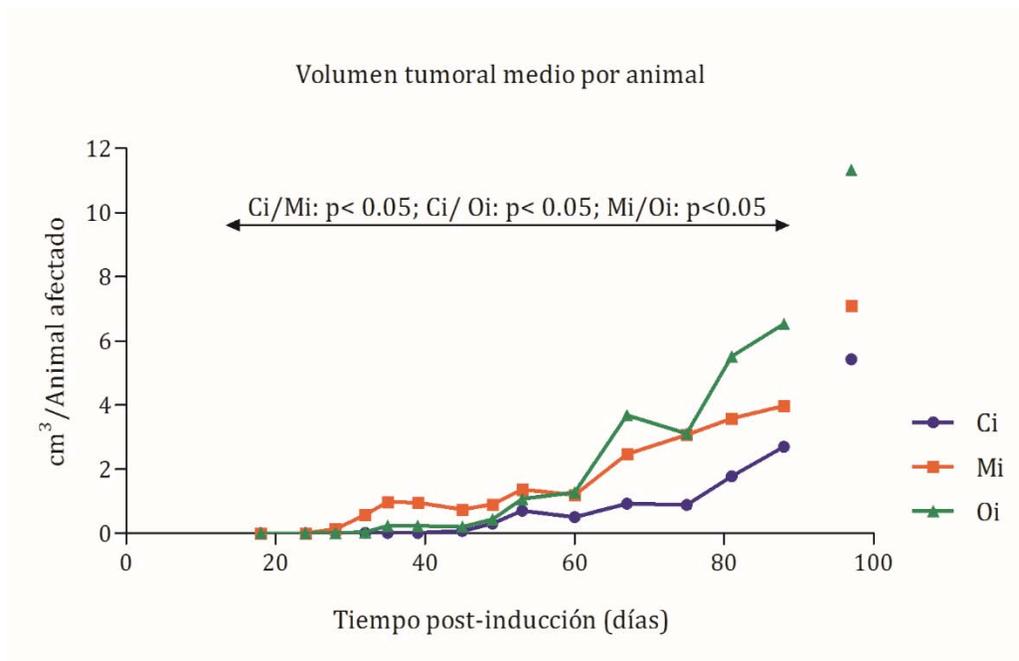
El análisis de las curvas del volumen tumoral total mostró que el grupo Ci presentó valores inferiores a los de los otros dos grupos a lo largo de todo el estudio. Además, en general, el volumen tumoral total fue inferior en el grupo Oi respecto al Mi, excepto en las últimas palpaciones donde el volumen en el grupo Oi fue superior al del Mi. En el sacrificio final los resultados del volumen fueron los siguientes: 48.8 cm<sup>3</sup> en Ci, 70.9 cm<sup>3</sup> en Mi y 113.4 cm<sup>3</sup> para Oi (Figura 97).

### 3.5.2.5.2. Volumen tumoral medio por animal (VA)

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

$$V_A = \frac{1}{n} \sum_{a=1}^n V_a = (1/n)V$$

Los valores de  $V_A$  ( $\text{cm}^3/\text{animal}$ ) aumentaron, en general, en todos los grupos experimentales a lo largo del tiempo, siendo el grupo Ci el que presentó, de forma estadísticamente significativa, los niveles más bajos en comparación con los otros dos grupos (Figura 98). Por otro lado, los grupos de dieta hiperlipídica presentaron valores variables, superiores para el grupo de aceite de maíz en la primera mitad del estudio y mayores para el grupo de dieta de aceite de oliva a partir de los 60 días post-inducción, aproximadamente. Las diferencias a lo largo del estudio entre estos dos grupos fueron estadísticamente significativas. En cambio, en el momento del sacrificio final no hubo tales diferencias (Figura 98).



**Figura 98. Volumen tumoral medio por animal de la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

### 3.5.2.5.3. Volumen tumoral medio por tumor (VK)

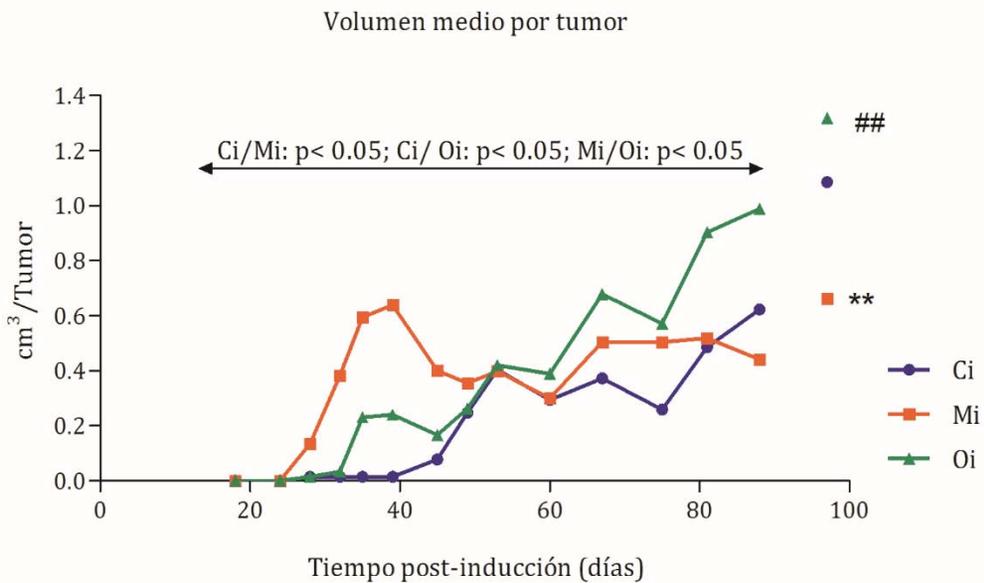
El volumen medio por tumor ( $\text{cm}^3/\text{tumor}$ ) del grupo vendrá dado por:

$$V_K = \frac{1}{K} \sum_{a=1}^n V_a = (1/K)V$$

## Resultados

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

Debido a las características de este parámetro, que tal y como se comentó en el caso del contenido tumoral medio se ve afectado por la aparición de nuevos tumores de volumen pequeño, el volumen medio por tumor presentó bastantes fluctuaciones. Del mismo modo que con los otros dos parámetros de volumen, el grupo Ci presentó los valores más bajos. El grupo Mi presentó los valores más altos hasta aproximadamente el día 55 y a partir de entonces fue el grupo Oi el que pasó a tener el mayor volumen tumoral medio por tumor (Figura 99). En el momento del sacrificio final el grupo Oi presentó los valores más altos seguido del grupo Ci y del Mi. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.



**Figura 99. Volumen medio por tumor en la patología mamaria maligna de los diferentes grupos experimentales.** Ci: grupo control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido. \*\* p < 0.05 vs. Ci; ## p < 0.05 vs. Mi en test de U de Mann Whitney.

**ÍNDICE**

**INTRODUCCIÓN**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**





## **1. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES SANOS**

Con el fin de asegurar la especificidad de los resultados, en primer lugar se quiso constatar el correcto desarrollo de los animales. Teniendo en cuenta que el peso corporal es un buen reflejo de éste, los resultados del estudio de la evolución ponderal y de la masa corporal mostraron la idoneidad de las tres dietas experimentales para producir el crecimiento normal de los animales del ensayo. Dicho crecimiento fue homogéneo en todos los grupos experimentales, como refleja la pequeña magnitud de las diferencias observadas a lo largo del tiempo y el paralelismo de las curvas de evolución ponderal. Además los coeficientes de variación fueron uniformemente bajos, indicando que no existían diferencias individuales entre los pesos de los animales de un mismo grupo. El estudio del crecimiento de los animales se completó con la determinación del IMC y el índice de Lee, éste último específico del grado de adiposidad en rata (Ip et al., 1980). Los resultados mostraron que en el caso de los parámetros del peso corporal y el IMC aumentaron paulatinamente en todos los grupos, y más rápidamente en las primeras edades del animal. En el caso del índice de Lee, se produjo un descenso desde los 24 días de edad, inicio del estudio, hasta los 40 días de edad aproximadamente, momento en el que los valores para todos los grupos parecieron estabilizarse. La menor variación encontrada en este parámetro respecto a los otros dos probablemente es debida a las características de la ecuación para su cálculo, en la cual la importancia del parámetro que más varía, el peso corporal, es menor.

Por otra parte, cabe destacar que la ausencia de patologías significativas halladas en las exploraciones realizadas sistemáticamente a lo largo del ensayo permitió descartar que se hubieran producido alteraciones por desequilibrios nutricionales (Rogers, 1979; Subcomitee on laboratory animal nutrition, 1978; Martinez de la Vistoria, 200).

Por tanto, los resultados obtenidos del correcto crecimiento de los individuos junto con la ausencia de patologías reflejaron la idoneidad de las dietas para realizar el estudio, indicando que ni la dieta ni otros factores experimentales ejercieron un efecto inespecífico sobre los resultados, ni selectivo sobre los individuos. En caso contrario, los animales se hubieron adaptado, aumentando así la variabilidad de las respuestas individuales.

Un segundo aspecto a considerar es el posible efecto diferencial de los tipos de dieta hiperlipídica sobre el peso y la masa corporal. En este sentido, los animales alimentados con la dieta de aceite de maíz mostraron un aumento significativo del peso corporal así como del IMC. En cambio, los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva presentaron unos valores similares al grupo de dieta control en ambos parámetros. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en un estudio previo del grupo investigador desarrollado en otra serie experimental. Otros autores también han descrito un efecto diferencial del tipo de grasa de la dieta sobre el peso corporal. Así, estudios en modelos en rata han descrito un aumento del peso por efecto de una dieta hiperlipídica de PUFA n-6 en comparación con una dieta control (Innami et al., 1973; Frisch et al., 1975). En cuanto al efecto de las dietas hiperlipídicas de aceite de oliva existen menos datos en la literatura. En ratas ha sido descrito que la administración de una dieta rica en aceite de oliva virgen extra durante 28 días produce una disminución del peso corporal en comparación con una dieta hiperlipídica de aceite de maíz (Oi-Kano et al., 2007). Por otro lado, estudios epidemiológicos que han analizado los efectos beneficiosos de una dieta con un contenido relativamente elevado de aceite de oliva concluyen que dicha dieta no provoca un aumento del peso corporal (Estruch, 2010). Además, en otros estudios en humanos se ha relacionado el consumo durante 4 semanas de una dieta hiperlipídica de ácidos grasos saturados (40% de la energía total) con un aumento del peso corporal, mientras que una dieta hiperlipídica basada en aceite de oliva se ha asociado con una disminución de dicho peso (Piers et al., 2003). En el estudio previo del grupo investigador anteriormente citado, también se demostró que la dieta rica en aceite de maíz administrada desde el destete aumentaba el peso y la masa corporal mientras que dicho efecto no se producía por efecto de la dieta de aceite de oliva. Además, se pudo constatar que dicha dieta aumentaba la expresión hepática de UCP2, sugiriendo una disminución del balance entre consumo y gasto

## *Discusión*

energético (Moral et al., 2016). Estos cambios también se asociaron a un aumento de los niveles de expresión de oxitocina hipotalámica así como a un tendencia al aumento de niveles de OEA por parte de dicha dieta, protegiendo así de la obesidad en comparación con una dieta rica en aceite de maíz (Sospedra et al., 2015). Por tanto, existen suficientes evidencias de que además de la cantidad total de grasa ingerida existe un aspecto cualitativo relacionado con el tipo de lípido consumido en el control y mantenimiento del peso corporal. Es interesante destacar que la obesidad y la maduración sexual precoz asociada al balance energético positivo constituyen factores de riesgo del cáncer de mama en humanos (Hsieh et al., 1990; WCRF/AICR, 2007).

Dentro ya del estudio del estrés oxidativo, en primer lugar, se caracterizó el perfil de expresión de las enzimas antioxidantes en hígado y en glándula mamaria. Para ello se analizaron las enzimas CAT, SOD, GPX y GR ya que se consideran las principales enzimas que actúan como barrera fisiológica para la eliminación de los ROS (Valko et al., 2006). Se estudiaron en 4 edades distintas de la rata, representativas de diferentes estados de maduración: prepuberal, postpuberal inmediada, adulta joven y adulta avanzada. Se ha descrito que los lípidos de la dieta pueden afectar la expresión de estas enzimas (Ruiz-Gutierrez et al., 1999). En el caso de SOD y GPX se determinaron los niveles de expresión de aquellas isoformas que presentaban mayor interés. Así, de SOD se estudiaron la isoforma citosólica (CuZnSOD/SOD1) y la mitocondrial (MnSOD/SOD2) ya que está descrito que pueden estar afectadas por los lípidos de la dieta (Taranu et al., 2014; Lluís et al., 2013). De GPX se estudiaron las isoformas citosólica (cGPX) y la PHGPX, por ser la única peroxidasa que actúa sobre los hidroperóxidos de fosfolípidos incorporados en membrana (Loscalzo, 2008). Los resultados mostraron que en hígado la enzima antioxidante de expresión mayoritaria fue CAT, seguida de GPX1, SOD1, GPX4, y finalmente SOD2 y GR, con niveles de expresión muy similares entre sí. En glándula mamaria el orden de magnitud de las enzimas fue muy similar: CAT, GPX1, GPX4, SOD1, SOD2 y GR. Este orden de magnitud en general se mantuvo en ambos tejidos en todas las edades estudiadas. Cabe destacar que los niveles de expresión de las enzimas CAT, SOD1 y GPX1 fueron superiores en hígado que en glándula mamaria, independientemente del tipo de dieta. Concretamente, los niveles de expresión de CAT y GPX1 en general y de SOD1 a 150 días fueron del orden de 5 veces superiores

en hígado. En cambio, GPX4, SOD2 y GR mostraron una expresión similar en ambos tejidos. Estos resultados concuerdan con los descritos en la literatura, donde se ha establecido que CAT, SOD1 y GPX1 se expresan mayoritariamente en hepatocitos (Kinnula and Crapo, 2004; Jefferies et al., 2003; Jung and Henke, 1996). Por otra parte, los lípidos de la dieta no modificaron de manera significativa el orden de magnitud de la expresión de las enzimas antioxidantes en ninguno de los dos tejidos. Esta ausencia de diferencias entre tejidos y por efecto del tratamiento dietético sugiere la importancia de estas enzimas en la respuesta antioxidante celular, y concuerda con lo descrito por otros autores que describen a CAT, GPX y SOD como las enzimas antioxidantes más eficientes y que constituyen la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo (Valko et al., 2006; Mates et al., 1999).

Respecto a los cambios de expresión de las enzimas antioxidantes debidos a la edad, se comprobó que los niveles de SOD1 y SOD2 aumentaron significativamente en hígado, mientras que los del resto de enzimas se mantuvieron constantes. En glándula mamaria, en cambio, no se observaron grandes cambios de expresión con la edad. El aumento de SOD1 en hígado fue independiente del tipo de dieta, mientras que el aumento de SOD2 no se observó en las dietas hiperlipídicas. Estudios realizados en cerebro de rata han justificado este aumento como un mecanismo de defensa contra la acumulación de ROS con la edad, y en particular el  $O_2^{\cdot}$  (Santiago et al., 1993). Sin embargo, otros estudios han descrito un aumento general de la actividad las enzimas antioxidantes con la edad en tejido muscular pero una disminución en tejido hepático (Ji et al., 1990).

En segundo lugar, se analizaron los efectos de los lípidos de la dieta sobre la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes tanto en hígado como en glándula mamaria. Los resultados mostraron que en hígado los lípidos de la dieta no modificaron significativamente los niveles de CAT, SOD1 y SOD2. En este sentido, otros autores también han descrito que las dietas ricas en grasas no modifican los niveles de actividad de CAT en hígado de ratones (Noeman et al., 2011). Sin embargo, sí se encontró un efecto de los lípidos de la dieta en las enzimas relacionadas con el ciclo del GSH (GPX1, GPX4 y GR). Así, las dietas hiperlipídicas generalmente aumentaron la expresión GPX. La dieta de aceite de maíz aumentó la expresión de GPX4 a lo largo de todo el ensayo y la de GPX1 hasta día 58, y la dieta de aceite de oliva generalmente tendió a aumentar la de ambas isoformas. Estos

## *Discusión*

resultados se asociaron a un aumento de actividad GPX a lo largo del tiempo debido a las dietas hiperlipídicas, de forma significativa en el caso de la dieta de aceite de maíz. En este caso, los resultados sugerirían que dicho aumento se produciría a expensas de GPX4 más que de GPX1, a pesar de ser ésta última la isoforma mayoritaria. Este hecho sería compatible con una mayor oxidación de los fosfolípidos de la membrana en los grupos de dieta hiperlipídica, especialmente de aceite de maíz, como se discutirá más adelante. En general, los niveles de expresión de GPX y los de su actividad no se hallaron correlacionados entre sí. La falta de correlaciones significativas podría ser debida al tamaño de la muestra del estudio (n=5). Por otra parte, la dieta de aceite de maíz mostró una tendencia a lo largo del tiempo a disminuir los niveles de expresión de GR respecto a las otras dos dietas. Por tanto, en líneas generales, dicha dieta aumentaría la expresión y actividad GPX a la vez que disminuiría la expresión de GR respecto a la dieta normolipídica. Los efectos encontrados para la dieta de aceite de oliva fueron en el mismo sentido en el caso de GPX pero no para GR, cuya expresión fue similar a la del grupo control.

La influencia de los lípidos de la dieta sobre GPX y GR junto con la ausencia de efectos sobre el resto de enzimas antioxidantes están en línea con trabajos que han descrito la GPX como la enzima más importante que regula el estrés oxidativo celular. En condiciones normales, la inhibición de esta enzima parece ser suficiente para alterar la supervivencia de la célula (Remacle et al., 1992). Además, el aumento de la actividad GPX se ha correlacionado con la ingesta de una dieta rica en PUFAs (Codoner-Franch et al., 2009). Tanto CAT como GPX son capaces de neutralizar los peróxidos, pero se ha descrito la mayor capacidad de GPX para neutralizar los hidroperóxidos lipídicos (Fernandes et al., 1996). Además, numerosos trabajos han demostrado efectos de los lípidos de la dieta sobre el ciclo del glutatión (Venkatraman et al., 1998; Abel et al., 2004). Así, se han relacionado mayores niveles de estrés oxidativo con mayores niveles de GPX y GR, lo que se traduciría en una aceleración del ciclo del GSH (Kim et al., 2003). Los mayores niveles de expresión y actividad de GPX debidos a las dietas hiperlipídicas sugieren unos mayores niveles de estrés oxidativo respecto la dieta control. Además, la expresión de GR no sólo no aumentó, a diferencia de lo descrito por otros autores, sino que disminuyó por efecto de la dieta de aceite de maíz sugiriendo una menor regeneración del glutatión oxidado y, en consecuencia, niveles todavía superiores de estrés oxidativo por efecto

de la dieta de maíz en comparación a la de aceite de oliva. Aún y así, cabría comprobar la menor actividad de GR ya que se ha descrito que la disminución de su expresión puede no verse traducida en una disminución de su actividad (Rhee et al., 2005; Begara-Morales et al., 2016). El mayor nivel de estrés oxidativo causado por las dietas hiperlipídicas, y especialmente la dieta de aceite de maíz, podría ser debido tanto a la elevada ingesta de lípidos como a la elevada susceptibilidad de los PUFA n-6 a oxidarse y convertirse en radicales libres (Wagner et al., 1994).

A partir de estos resultados, y para profundizar en los mecanismos por los cuales los lípidos de la dieta podrían afectar de manera diferencial la expresión de las enzimas antioxidantes GPX y GR, se determinaron los niveles del factor de transcripción NRF2, ya que está descrito que mediante su unión a las secuencias ARE promotoras es capaz de inducir la expresión de la GR (Harvey et al., 2009) y la GPX (Leong, 2016). Los resultados mostraron que los lípidos de la dieta no modificaron significativamente los niveles totales de NRF2 a lo largo del tiempo, aunque se observó una tendencia en la dieta aceite de maíz a presentar niveles inferiores a los de la dieta control. Estos resultados concuerdan con lo descrito en un estudio en el que se muestran unos menores niveles de expresión de NRF2 en ratones alimentados con dieta hiperlipídica (Tanaka et al., 2008). Respecto a los niveles de activación de NRF2, los resultados no mostraron una tendencia clara, aunque en general las dietas hiperlipídicas se asociaron a unos niveles inferiores de activación que la dieta normolipídica. Por tanto, la posible influencia de las dietas hiperlipídicas sobre la expresión y/o activación de NRF2 y su papel en la regulación de la expresión de GPX y GR no queda clara a partir de los resultados obtenidos. Cabe señalar que el sistema de activación de NRF2 está en constante estudio ya que no está totalmente dilucidado. Se ha descrito que la oxidación de las Cys presentes en la estructura de KEAP1 sería suficiente para la translocación de NRF2 al núcleo (Zhang and Hannink, 2003; Dinkova-Kostova et al., 2002). En este sentido, los PUFA-n3, concretamente el DHA y el EPA, son capaces de activar directamente NRF2 mediante su desestabilización del complejo KEAP1 y CULLIN3 (Gao et al., 2007). Sin embargo, algunos autores han propuesto que la activación de NRF2 depende de otros factores y que el factor limitante todavía se desconoce (Gao et al., 2007; Hong et al., 2005). Las dietas ricas en PUFA n-6 o MUFA podrían, por tanto, no estar

## *Discusión*

afectando directamente sino a otros mecanismos implicados en la regulación de la expresión de GPX y GR.

El análisis de los efectos de los lípidos de la dieta sobre la expresión de las enzimas antioxidantes también se efectuó en la glándula mamaria. Cabe destacar que se observaron menos cambios que en el tejido hepático. Únicamente se halló una tendencia por parte de la dieta de aceite de maíz a presentar una mayor expresión de GPX1, igual que en hígado. Debido a la ausencia de tendencias claras en los niveles de expresión los ensayos de actividad en este tejido no se realizaron. Estos resultados sugieren que los lípidos de la dieta ejercerían un mayor efecto sobre la defensa antioxidante enzimática en un órgano metabolizador clave como es el hígado que en un órgano periférico como es la glándula mamaria. También cabe la posibilidad de que la escasa influencia de la dieta en este órgano sea debido a su administración crónica. Son pocos los trabajos que han descrito efectos de los lípidos de la dieta sobre el tejido mamario sano. Así, una dieta normolipídica rica en PUFA n-3 ejerció un efecto protector sobre la glándula, aumentando las enzimas antioxidantes y disminuyendo el daño oxidativo sobre el DNA (Bartsch et al., 1999). Otros autores han descrito el efecto contrario al aumentar la ratio n-6/n-3 en la dieta (MacLennan and Ma, 2010).

El siguiente paso en el estudio consistió en el análisis de la defensa antioxidante no enzimática, en concreto del ciclo del glutatión. Así, se determinaron los niveles de los principales parámetros de éste compuesto en plasma, ya que está descrito que el glutatión puede ser transportado fuera de las células por difusión facilitada a través de proteínas transportadoras (Townsend et al., 2003). El glutatión plasmático se origina principalmente en el hígado aunque una pequeña parte procede del intestino y alcanza el hígado por el sistema portal (Wu et al., 2004). Además, los niveles del compuesto en plasma ofrecen una visión más general o sistémica del estado oxidativo del organismo. A pesar de que en la literatura se han descrito efectos de los lípidos de la dieta sobre los niveles plasmáticos de GSH (Romieu et al., 2008; Meza-Miranda et al., 2014), los resultados de este trabajo no mostraron un efecto claro de las dietas hiperlipídicas del estudio sobre los parámetros de GSH. Las dietas hiperlipídicas en general se asociaron a mayores niveles plasmáticos de GSSG, de forma cercana a la significación a lo largo del tiempo en el caso de la dieta de aceite de maíz, y significativamente en 2 edades concretas (54 y 55 días) en el caso de la

dieta de aceite de oliva. Además, la dieta de aceite de oliva disminuyó la ratio GSH/GSSG a 54 días. Dicha ratio se considera un buen marcador de estrés oxidativo (Jones, 2002; Jones, 2006). Mientras algunos autores han descrito que una dieta rica en grasas tiende a disminuir los niveles de GSH total en hígado de ratas (Noeman et al., 2011), otros estudios han mostrado un aumento de los niveles de GSH en tejido cardíaco de ratones obesos como resultado de una mayor necesidad de defensa frente a los mayores niveles de estrés debidos a la obesidad (Vincent et al., 2001; Noeman et al., 2011). Por otro lado, también se ha descrito el efecto de los compuestos dietéticos antioxidantes sobre la ratio GSH/GSSG. En este sentido, estudios realizados en ratones alimentados con una dieta rica en semillas de uva mostraron un aumento de dicha ratio en el hígado. Estos efectos se atribuyeron a los polifenoles de la uva, que al aumentar la ratio GSH/GSSG ejercerían un efecto protector frente al estrés oxidativo. Además, estudios recientes muestran este mismo efecto en plasma de personas alimentadas con una dieta rica en aceite de oliva (Meza-Miranda et al., 2014). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los resultados de este trabajo no mostraron dicho aumento de la ratio GSH/GSSG en el grupo de dieta de aceite de oliva. Es posible que al tratarse de una dieta hiperlipídica los posibles efectos beneficiosos de los componentes minoritarios del aceite de oliva hayan quedado enmascarados. También debe considerarse la posibilidad de que los niveles de glutatión en plasma no reflejen los niveles de este compuesto a nivel tisular. Así, algunos autores han descrito la falta de correlación entre los niveles de GSSG en plasma y en otros tejidos (Ikegami et al., 1994). En este sentido, sería interesante determinar los niveles hepáticos de GSH y GSSG en hígado, ya que éstos podrían verse afectados por el efecto diferencial de las dos dietas hiperlipídicas sobre la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes en este tejido. Diversos estudios han descrito una correlación positiva entre los niveles de GSSG y GPX en eritrocitos de ratones (Romeu et al., 2002). Finalmente, cabe considerar que la regulación del ciclo del GSH es un proceso complejo que depende de muchos factores (Wu et al., 2004), por lo que otros mecanismos (como la biodisponibilidad de aminoácidos) podrían enmascarar los efectos de estas dietas sobre los parámetros del GSH.

El último apartado del estudio en animales sanos consistió en el análisis de los niveles de daño oxidativo en los lípidos de membrana. Para ello se determinaron los

## *Discusión*

niveles de MDA, ya que es el principal producto de la peroxidación lipídica (Marnett, 2002). El análisis se realizó en plasma con el objetivo de conocer el estado de peroxidación lipídica a nivel sistémico (Chalasan et al., 2004). Diversos estudios han demostrado los efectos de la dieta, y en concreto de los lípidos, sobre los niveles de peroxidación lipídica (Hu et al., 1989; Benzie, 1996). Los resultados mostraron una tendencia en el grupo de aceite de maíz a presentar unos niveles plasmáticos de MDA más elevados que el resto de grupos a lo largo del tiempo. Además, en la mayoría de las edades analizadas los niveles de MDA en este grupo fueron mayores que en el grupo control o el grupo de aceite de oliva. Este último grupo en general presentó los menores niveles, aunque de forma significativa respecto al control sólo a 100 días. Estos resultados concuerdan con los de la literatura, donde se han descrito mayores niveles de MDA en hígado y sangre de ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de maíz (Haggag Mel et al., 2014). Ello está de acuerdo con que el aumento de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta aumenta la susceptibilidad de los lípidos de membrana a ser oxidados (Wagner et al., 1994). Por otra parte, se ha descrito que la peroxidación lipídica aumenta la expresión de GPX4 como defensa frente a los mayores niveles de estrés. La hepoxilina A3, un producto de la peroxidación lipídica derivado del ácido araquidónico, un PUFA n-6, se ha demostrado capaz de inducir la expresión de dicha enzima (Zafiriou et al., 2007). En este sentido, el aumento de expresión de GPX4 causado por la dieta de aceite de maíz podría estar relacionado con el aumento de peroxidación lipídica de esta dieta. Asimismo, diversos estudios muestran un papel protector de las dietas de aceite de oliva sobre la peroxidación lipídica, debido principalmente a su contenido en componentes minoritarios antioxidantes como polifenoles (Kirimlioglu et al., 2008; Kanner et al., 2012) o vitamina E (Mataix et al., 1998). El hecho de que la dieta de aceite de oliva fuera hiperlipídica podría justificar, tal como se comentó anteriormente, la falta de mayores diferencias respecto al control, ya que el aumento de los niveles de MDA debido al mayor contenido lipídico en general e insaturado en particular, podría haberse contrarrestado parcialmente por los efectos de los componentes minoritarios de este aceite.

## **2. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENÉISIS**

Tras los resultados obtenidos en animales sanos, se procedió a estudiar los posibles efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en el período de la iniciación de la carcinogénesis mamaria, ya que se ha descrito que dicho estrés juega un importante papel en el inicio de la carcinogénesis (Valko et al., 2006), El carcinógeno químico utilizado en el modelo experimental del estudio, el DMBA, es un hidrocarburo aromático policíclico que tras su metabolización, fundamentalmente hepática, genera metabolitos reactivos que actúan como radicales libres aumentando el estrés oxidativo (Xue and Warshawsky, 2005).

En primer lugar, se estudiaron los efectos de los lípidos de la dieta sobre la expresión y actividad de las diferentes enzimas antioxidantes, tanto en hígado como en glándula mamaria, dado que se ha descrito una desregulación de estas enzimas en cáncer (Oberley and Oberley, 1997) y, en particular, en cáncer de mama (Padmavathi et al., 2006). El estudio en hígado reveló que las enzimas que se vieron más afectadas por los lípidos de la dieta fueron, al igual que en los animales sanos, la GPX y la GR, mientras que en el resto de enzimas no se apreciaron grandes cambios ni tendencias generales. En general, las dietas hiperlipídicas aumentaron la expresión y actividad de GPX y disminuyeron la expresión de GR en la etapa de la iniciación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en animales sanos e indicarían que dichas dietas, en comparación a la dieta normolipídica, aumentan el nivel de estrés oxidativo a nivel hepático tras la administración del carcinógeno. Tal como ya se comentó en el apartado anterior, en la literatura se han relacionado mayores niveles de GPX con mayor estrés oxidativo (Kim et al. 2003). Además, el aumento de actividad GPX en respuesta al consumo de dietas ricas en grasas se ha descrito mayor en dietas ricas en ácido linoleico que en oleico (Chen et al., 1993).

A la vista de los resultados, se consideró de importancia comprobar si la disminución de la expresión de la GR por parte de las dietas hiperlipídicas se acompañaba de una disminución de su actividad. Ésta se determinó a los 52 días de edad de los animales, 24 horas antes de la administración del carcinógeno, y a las 48 horas post-inducción, o 55 días de edad, dado que la disminución de la expresión fue

## Discusión

significativa a esta edad. Los resultados mostraron que a 52 días la dieta rica en aceite de maíz, pero no la de aceite de oliva, también disminuía la actividad GR, pero a las 48 horas de la administración del carcinógeno no hubo diferencias por efecto de la dieta. Por tanto, la disminución observada en la expresión de GR por efecto de las dietas hiperlipídicas no se correspondió del todo con una menor actividad enzimática. Cabría considerar la posibilidad que cambios en la expresión detectados en un momento determinado se tradujeran en cambios de actividad en un tiempo posterior.

Cuando se analizó el posible papel del factor de transcripción NRF2 en los efectos de los lípidos de la dieta sobre la expresión antioxidante en hígado en el periodo de la iniciación, los resultados mostraron la misma tendencia que en los animales sanos. Así, la dieta de aceite de maíz disminuyó tanto los niveles totales de NRF2 como su activación, respecto a las otras dos dietas. Esta disminución del factor de transcripción estaría de acuerdo con la disminución de la expresión de GR observada también por efecto de esta dieta, pero no con el aumento de expresión de GPX. Tal como ya se discutió en el apartado anterior, la influencia de los lípidos de la dieta sobre la expresión de enzimas antioxidantes, *a priori* regulados por NRF2, podría realizarse a través de otros mecanismos. En este punto es interesante destacar que resultados previos del grupo de investigación sobre el papel de los lípidos de la dieta en el metabolismo de xenobióticos obtenidos en esta misma serie experimental revelaron también una disminución de la expresión de NQO1 (Manzanares, 2016), un gen que codifica una enzima de fase II cuya expresión está regulada, al menos en parte, por NRF2 (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010).

En cualquier caso, la propia disminución de NRF2 asociada a la dieta de aceite de maíz, tanto antes de la administración del carcinógeno como después, podría haber tenido un papel en la iniciación de la carcinogénesis y, por tanto, en el desarrollo posterior de la enfermedad cancerosa, ya existen evidencias de que NRF2 juega un papel importante en la prevención de la carcinogénesis ejerciendo un efecto protector en las etapas tempranas de la enfermedad (Kwak and Kensler, 2010). En este sentido, también se ha descrito un fenotipo más agresivo de la carcinogénesis mamaria tras la administración de DMBA en ratones *knockout* para NRF2 que en ratones *wildtype* (Becks et al., 2010). Sin embargo, estudios recientes han mostrado la dualidad de NRF2, describiendo un papel protector en las etapas previas de la

carcinogénesis frente a un papel oncogénico/estimulador durante la progresión de la enfermedad (Moon and Giaccia, 2015). Una vez instaurada la carcinogénesis, una activación constitutiva de NRF2 podría inducir las defensas antioxidantes de manera descontrolada, lo que conllevaría un aumento de supervivencia celular y una evasión de las vías apoptóticas (Jaramillo and Zhang, 2013; Satoh et al., 2013). En este trabajo los menores niveles de NRF2 durante la iniciación de la carcinogénesis debido a la dieta de aceite de maíz se asociaron a una mayor carcinogénesis tal como se discutirá en el apartado 3 de la Discusión.

Independientemente de los efectos de los lípidos de la dieta, los resultados también mostraron la disminución de la expresión hepática de CAT y GPX a las 12 horas de la administración del carcinógeno, que retornó a los niveles previos a las 48 horas (55 días). Esta disminución de la expresión se asoció a una disminución de los niveles totales de NRF2 al mismo tiempo y a un aumento de su retención citoplasmática a las 48 horas. No se produjo, sin embargo, una disminución de la actividad CAT ni GPX, sugiriendo la existencia de modificaciones posttraduccionales en la regulación de estas enzimas (Sadi et al., 2014). Además, la expresión de SOD1 aumentó a lo largo de la etapa de la iniciación. No se han encontrado datos en la literatura sobre cambios en los niveles de expresión de enzimas antioxidantes tras la administración de carcinógenos químicos cuya metabolización genera aumento de ROS.

En glándula mamaria los efectos de los lípidos de la dieta sobre la expresión de las enzimas antioxidantes fueron distintos a los encontrados en hígado, sugiriendo que los lípidos de la dieta tendrían efectos específicos de tejido. Así, en el tejido mamario se observó una disminución generalizada de la expresión de las enzimas antioxidantes por efecto de los lípidos de la dieta. Concretamente, ambas dietas disminuyeron la expresión de CAT a las 12 horas, de SOD1 a las 12 y 24 horas, y de SOD2 a las 24 horas. Además, la dieta de aceite de maíz también disminuyó la expresión de GPX1 y GPX4 a las 24 h, y la dieta de aceite de oliva la de CAT a las 24 horas, la de SOD2 a las 12 horas, la de GPX1 a las 48 horas, y la de GPX4 a las 12 y 48 horas. Esta dieta también disminuyó la expresión de GR a las 12 y 48 horas. Por tanto, la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes fue mayor por efecto de la dieta de aceite de oliva. La interpretación de datos relacionados con las defensas antioxidantes es compleja. Así, en la literatura se encuentran tanto trabajos

## *Discusión*

que describen que los menores niveles de defensas antioxidantes son consecuencia de una menor necesidad de detoxificación, como trabajos que describen que esta disminución de la defensa antioxidante es la causa del aumento de los niveles de estrés oxidativo (Kinnula and Crapo, 2004; Valko et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo junto con todos los datos que apoyan la hipótesis de que las dietas ricas en grasas provocan un aumento de estrés oxidativo sugieren que en el tejido diana las dietas hiperlipídicas y, en especial, la dieta de aceite de oliva, provocó un aumento del estrés oxidativo durante el periodo de la iniciación de la carcinogénesis, debido principalmente a una disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes. En este sentido, la dieta de aceite de oliva estaría provocando unos mayores niveles de estrés oxidativo en el tejido diana del carcinógeno. Tal como se discutirá más adelante, los resultados de los niveles de daño oxidativo en el ADN en este tejido fueron en el mismo sentido.

Respecto a la defensa antioxidante no enzimática, las dietas hiperlipídicas provocaron una disminución de las ratios GSH/GSSG y GSH/GSH<sub>total</sub> y unos mayores niveles de GSSG a las 24 y 48 horas de la inducción con el carcinógeno. Estos efectos podrían ser debidos, al menos en parte, al efecto que dichas dietas ejercieron sobre dos de las principales enzimas del ciclo del glutatión en el hígado, el aumento de actividad GPX y la disminución de la expresión de GR. Ambos efectos irían a favor de los resultados de los niveles plasmáticos de glutatión. De esta manera, el aumento de GSSG sería consecuencia del aumento de la actividad GPX (como principal producto de su catálisis) así como de la disminución de GR, que implicaría una acumulación del GSSG por una menor regeneración. Aunque ambas dietas hiperlipídicas tuvieron unos efectos similares entre sí, también existieron efectos diferenciales entre ellas, como la disminución de la actividad de la GR en el momento previo a la administración del carcinógeno por parte de la dieta de aceite de maíz, que podría haber condicionado la capacidad de regeneración del GSSG después de dicha administración.

Cabe destacar que con independencia del tipo de dieta, 12 horas después de la administración del DMBA se produjo una disminución de los niveles totales de glutatión así como una disminución de GSH y GSSG. Previsiblemente la disminución de las formas oxidada y reducida de GSH fue consecuencia de la disminución de los niveles totales, de manera que al disminuir ambas formas la ratio GSH/GSSG no se

modificó. Con estos datos, se podría afirmar que la administración del carcinógeno, además de inducir cambios en las enzimas antioxidantes, provocó cambios en el sistema del glutatión. Algunos autores han descrito que cuando aumentan los aductos del glutatión se puede producir una disminución de sus niveles totales. Este hecho ocurriría porque la formación de estos aductos conllevaría una disminución del glutatión "libre" o "cuantificable" (Januel et al., 2003). Así, la disminución de los niveles totales de glutatión observada tras la administración del carcinógeno podría ser consecuencia de la elevada generación de metabolitos reactivos del DMBA y la posterior formación de aductos de dichos metabolitos con el glutatión, como mecanismo de defensa frente el aumento de moléculas reactivas. En un trabajo previo desarrollado en esta misma serie experimental se demostró la producción hepática de dichos metabolitos en las horas inmediatamente posteriores a la administración intragástrica del DMBA. Concretamente, se observó un aumento de los niveles plasmáticos de 3-OH-DMBA, 3,4-diOH-DMBA y 12-OH-Me-7-MBA (Manzanares, 2016). Estos metabolitos son capaces de formar aductos con el glutatión (Johnson et al., 2003). Por otra parte, cabe la posibilidad de que la disminución de los niveles totales de glutatión también fuera consecuencia de una disminución en su síntesis. Así, se determinó la expresión de una de las enzimas principales de la síntesis del glutatión, la GSS (Townsend et al., 2003), en el momento previo a la administración del DMBA y a las 24 y 48 horas después. Se ha demostrado una asociación entre los niveles de expresión de esta enzima y los niveles de glutatión totales en hígado (Luo et al., 1998). Sin embargo, los resultados mostraron que los cambios en los niveles totales de glutatión no se asociaron a una disminución de la expresión de la enzima GSS. Aún y así cabría determinar la actividad de esta enzima para poder descartar definitivamente su implicación en los cambios observados en el glutatión. También cabría considerar que la expresión de GSS en hígado pueda no asociarse a los niveles plasmáticos de glutatión. Finalmente, la síntesis de glutatión es un proceso complejo en el que intervienen múltiples enzimas además de la GSS, como la  $\gamma$ GCS (Lu, 2013). Por tanto, para confirmar que no se producen cambios en la síntesis de glutatión cabría evaluar también otros enzimas.

Una vez analizados los efectos de los lípidos de la dieta en la defensa antioxidante enzimática y no enzimática durante la ventana de la iniciación de la carcinogénesis,

## Discusión

se procedió a evaluar sus efectos sobre el daño en macromoléculas. Respecto al daño oxidativo sobre los lípidos, la dieta de aceite de maíz provocó un aumento de los niveles plasmáticos de MDA respecto a los otros dos tipos de dieta, siendo significativamente superiores a las 12 horas de la inducción con el carcinógeno respecto al control, sugiriendo mayores niveles de estrés oxidativo. Estos resultados estarían en línea con los obtenidos por *Mansara* y colaboradores, que demostraron una correlación positiva entre los niveles de peroxidación lipídica y el tratamiento con PUFA de diferentes ratios crecientes n-6/n-3 en células de cáncer de mama (*Mansara et al., 2015*). Los niveles de peroxidación lipídica en cáncer son actualmente materia de debate. En células de hepatoma se han relacionado bajos niveles de peroxidación lipídica con células poco diferenciadas y elevada capacidad proliferativa (*Hammer et al., 1997*). Sin embargo, otros estudios han demostrado niveles elevados en células tumorales al compararlas con tejido sano (*Young et al., 2010; Skrzydlewska et al., 2001*). También se ha descrito que unos niveles elevados de peroxidación lipídica en células cancerígenas pueden conllevar la activación de vías apoptóticas (*Barrera, 2012*). En este sentido, existen estudios que han descrito que el tratamiento de células cancerígenas con el PUFA n-3 DHA provoca la sensibilización de éstas al tratamiento con trióxido de arsénico al inducir la peroxidación lipídica y la activación de vías apoptóticas (*Sturlan et al., 2003*). Por el contrario, se ha postulado que si los niveles de peroxidación lipídica en células cancerígenas no son suficientemente elevados para inducir la apoptosis, la situación resultaría perjudicial para la célula, ya que conllevaría un mayor daño en el ADN y un aumento de posibles mutaciones (*Barrera, 2012*). En base a todo ello y a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, sería interesante determinar el grado de peroxidación lipídica así como el grado de apoptosis en la propia glándula mamaria. Es interesante destacar que en relación al aceite de oliva, diversos estudios han demostrado la capacidad de algunos de sus compuestos minoritarios para inducir la apoptosis (*Fabiani et al., 2006*). Además, la peroxidación lipídica y las vías apoptóticas también se encuentran estrechamente relacionadas con los niveles de GSH, ya que existen estudios que demuestran una asociación entre la disminución de los niveles de GSH en tumores de animales inducidos con DMBA y la inducción de la apoptosis en el tejido tumoral (*Todorova et al., 2004*).

Para profundizar en el estudio de daño oxidativo se determinaron los niveles de proteínas oxidadas, concretamente de sus grupos carbonilo (Stadtman, 2001). En línea con lo esperado se observó que en el momento previo a la administración del carcinógeno las dietas hiperlipídicas, y especialmente la dieta de aceite de maíz, aumentaban el daño oxidativo en proteínas. Estos resultados concuerdan con lo descrito por algunos autores han descrito niveles elevados de proteínas oxidadas en ratas alimentadas con una dieta rica en PUFA n-6 (Gallardo et al., 2013).

Finalmente se analizó el daño a nivel de ADN en la glándula mamaria. Por una parte, se analizaron los niveles de daño total, mediante el ensayo Comet, y por otra de daño oxidativo, mediante la determinación de los niveles de la base modificada 8-OHdG. Respecto a los resultados del daño total en el ADN, éstos no fueron en línea con lo esperado, ya que el grupo control tendió a mostrar niveles de daño oxidativo más elevados que los grupos de dietas hiperlipídicas. Muy probablemente esta situación sea atribuible a aspectos metodológicos, dado que la técnica Comet, a pesar de no ser de una gran complejidad técnica, tiene aspectos críticos tales como el tiempo que pasa desde la obtención de la muestra hasta el inicio de su procesamiento. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los resultados obtenidos en este apartado no se consideraron concluyentes. La situación fue muy distinta en cuanto a la detección del daño oxidativo, a través de los niveles de 8-OHdG. Además ésta se complementó con el análisis de la expresión de las principales enzimas implicados en la reparación de dicha base dicha base, la PARP y la OGG (Noren Hooten et al., 2011). Los resultados mostraron que después de la inducción con el carcinógeno aumentó el daño oxidativo en todos los grupos experimentales sin observarse cambios en la expresión de las enzimas de reparación. Estos resultados están en línea con los de *Vinothini* y colaboradores que demostraron mayores niveles de 8-OHdG en ratas *Sprague Dawle* inducidas con DMBA al compararlas con ratas control (Vinothini et al., 2009). Otros autores han descrito un aumento de los niveles 8-OHdG en tejido mamario sano de pacientes con cáncer de mama al compararlas con tejido de mujeres sanas (Li et al., 2001). En líneas generales, en la literatura se describen unos niveles elevados de 8-OHdG en cáncer de mama (Soliman et al., 2004), próstata y vejiga (Chiou et al., 2003), y pulmón (Erhola et al., 1997). Es por ello que también se ha propuesto a esta base modificada como marcador de la progresión tumoral (Foksinski et al., 2000). Mientras que la principal

## Discusión

causa de los mayores niveles 8-OHdG son los mayores niveles de estrés oxidativo en la célula, las consecuencias no están del todo claras. Está descrito que el aumento de daño oxidativo en el ADN tiene como consecuencia la inestabilidad genómica y el aumento de la tasa de mutación, haciendo a la célula más vulnerable a la transformación neoplásica. En este sentido, se ha demostrado que muestras de cáncer de colon con unos niveles elevados de 8-OHdG presentaban más de dos mutaciones en genes supresores de tumores, siendo en un 71% de los casos p53 (Oliva et al., 1997). Sin embargo, el aumento de daño oxidativo en el ADN también puede tener consecuencias beneficiosas, como la inducción de la apoptosis de las células cancerosas (Radak and Boldogh, 2010).

Respecto a los efectos que los lípidos de la dieta tuvieron sobre los niveles de 8-OHdG, las dietas hiperlipídicas aumentaron los niveles de daño oxidativo en la glándula mamaria previamente a la inducción con el carcinógeno. Estos resultados están en línea con los descritos en la literatura, donde se ha demostrado que las dietas ricas en grasas provocan un aumento del daño de 8-OHdG en hígado de animales sanos (Eder et al., 2006). Además, en este mismo momento, las dietas hiperlipídicas también aumentaron la expresión de la enzima de reparación OGG, y la dieta de aceite de maíz también la de PARP. Doce horas después de la inducción con el carcinógeno también se observó este mismo efecto de las dietas hiperlipídicas pero en este caso la dieta de aceite de oliva provocó un aumento superior del daño de manera que los niveles de 8-OHdG fueron mayores que los de las otras dos dietas. A partir de las 24 horas de la inducción no se observaron efectos por parte de las dietas en los niveles de daño oxidativo en el ADN. El mayor daño oxidativo inducido por la dieta de aceite de oliva resultó *a priori* inesperado dado que se ha descrito una correlación positiva entre los niveles de 8-OHdG y la ingesta de ácido linoleico (Eder et al., 2006). Cabe destacar, que resultados previos del grupo de investigación desarrollados en otra serie experimental también demostraron un aumento por parte de la dieta de aceite de oliva del daño oxidativo en tejido mamario “sano” de animales con cáncer de mama inducido con DMBA. En cuanto a los efectos de los lípidos de la dieta sobre las enzimas de reparación tras la administración del DMBA, las dietas hiperlipídicas tendieron, al igual que en el momento previo a la inducción, a aumentar su expresión. Este aumento fue especialmente significativo en el caso de la dieta de aceite de maíz. En líneas generales, por tanto, la dieta de aceite de oliva

provocaría un aumento del daño oxidativo mayor que el aumento que indujo en la reparación, lo cual sugeriría unos niveles relativos de daño oxidativo mayores respecto a la dieta de aceite de maíz y la control. Sería interesante determinar la actividad de ambas enzimas de reparación, ya que está descrito que tanto la PARP (Desmarais et al., 1991) como la OGG (Slyskova et al., 2014) pueden sufrir modificaciones posttraduccionales que modificarían su actividad. En este sentido, recientemente se han identificado 8 formas de *splicing* así como 160 microRNAs responsables de la estabilidad del transcrito de OGG (Slyskova et al., 2014). El análisis de la actividad de estas enzimas ayudaría a conocer mejor el proceso de reparación del daño oxidativo tras el carcinógeno, así como los efectos diferenciales de las dietas. En cualquier caso, el relativo mayor daño oxidativo en el ADN de la glándula mamaria debido a la dieta de aceite de oliva estaría en línea con la disminución observada en la expresión de las enzimas antioxidantes por parte de dicha dieta en este mismo tejido. Diversos autores han relacionado un aumento de daño oxidativo o una menor defensa antioxidante con la activación de vías apoptóticas (Radak and Boldogh, 2010). En este sentido, se podría hipotetizar que la dieta de aceite de oliva, mediante la disminución de las defensas antioxidantes y la consecuente acumulación de daño oxidativo en el ADN, podría estar induciendo la apoptosis en el tejido diana del carcinógeno, la glándula mamaria, en los primeros momentos tras la administración del carcinógeno. En trabajos previos del grupo investigador realizados en otra serie experimental se demostró un aumento de apoptosis en los adenocarcinomas mamarios de los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva (Solanas et al., 2010). Asimismo, otros resultados previos mostraron una menor apoptosis en la glándula mamaria de animales de edad puberal y pospuberal (36 y 51 días, respectivamente) por parte de la dieta de aceite de maíz en comparación con los otros dos tipos de dietas (Moral et al., 2016). Todos estos resultados estarían de acuerdo con la menor carcinogénesis que se observó en los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva en comparación a los alimentados con la dieta de aceite de maíz. Diversos autores han demostrado los efectos beneficiosos de compuestos minoritarios de la dieta, como epigallocatequina, genisteína, curcumina o resveratrol, a través de la estimulación de la apoptosis, principalmente por la vía extrínseca (Khan et al., 2010). El efecto pro-apoptótico de algunos de estos compuestos también se ha relacionado con su capacidad pro-

oxidante. Así, recientemente se ha descrito que las características pro-oxidantes de los polifenoles serían la causa del aumento de daño oxidativo celular y la consecuente activación de las vías apoptóticas (Leon-Gonzalez et al., 2015).

### **3. EFECTOS DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA EVOLUCIÓN PONDERAL, LA CARCINOGENESIS MAMARIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ANIMALES INDUCIDOS CON EL CARCINÓGENO**

Tras investigar los efectos de las dietas ricas en aceite de maíz o en aceite de oliva en diferentes parámetros de estrés oxidativo en animales sanos a diferentes edades (apartado 1) y en la ventana de la iniciación de la carcinogénesis mamaria inucida con DMBA (apartado 2), se analizaron dichos efectos en animales adultos con cáncer de mama ya establecido. El objetivo último consistió en relacionar los efectos sobre el estrés oxidativo con la influencia que dichas dietas ejercieron en la carcinogénesis mamaria. Para ello, por una parte, se analizaron parámetros de estrés tanto en hígado como en glándula mamaria de animales previamente inducidos con el carcinógeno, a 100 y a 150 días, y, por otro, se realizó el estudio de la carcinogénesis.

Del mismo modo que en los animales sanos, y con el fin de asegurar la especificidad de los resultados, en primer lugar se constató el correcto desarrollo de los animales inducidos con el carcinógeno y alimentados con las distintas dietas experimentales a lo largo de todo el ensayo. Así, el análisis de la evolución ponderal y la masa corporal mostró que dicho crecimiento fue homogéneo en todos los grupos experimentales y que no existieron diferencias individuales entre los pesos de los animales de un mismo grupo. Ello, junto con la ausencia de patologías por desequilibrios nutricionales, reflejó la idoneidad de las dietas para realizar el estudio. Respecto al efecto diferencial de las dietas hiperlipídicas sobre el peso y la masa corporal, la dieta de aceite de maíz indujo un aumento significativo de ambos parámetros. En el caso de la masa corporal dicho aumento se observó en el Índice de Lee pero no en el IMC, al revés que en los animales sanos. Por su parte, la dieta de aceite de oliva no modificó el peso corporal, pero también se asoció a un aumento

significativo de la masa corporal respecto al control. Estos resultados no concordaron exactamente con los hallados en los animales sanos, aunque siguieron la misma tendencia excepto en el caso de la dieta de aceite de oliva y la masa corporal. Este hecho podría ser debido al efecto del carcinógeno o a la enfermedad cancerosa, que podrían haber modificado de alguna manera el efecto diferencial que estas dietas ejercerían en condiciones normales sobre el peso corporal y que ya se discutió en el apartado 1 de la Discusión. Así, es bien conocido que la demanda energética se encuentra aumentada en procesos cancerosos que en determinadas situaciones puede incluso llevar a la caquexia (Das and Hoefler, 2013).

El análisis de la defensa antioxidante enzimática a nivel hepático mostró relativos pocos cambios debidos a los lípidos de la dieta en comparación a los obtenidos en el periodo de la iniciación de la carcinogénesis (apartado 2 de la Discusión). Así, en los niveles de expresión las dietas no tuvieron prácticamente efectos, y en los de actividad la dieta de aceite de oliva aumentó la actividad GPX en a 150 días. Este hecho podría atribuirse a diferentes motivos, no excluyentes entre sí: i) que los animales jóvenes (postpuberales) respondan más a factores externos como la dieta; ii) que el periodo de la iniciación de la carcinogénesis sea especialmente sensible a la acción de tales factores; y iii) que el tratamiento crónico, a largo plazo, con las dietas experimentales disminuya sus efectos sobre los parámetros analizados.

Respecto al posible papel del factor de transcripción NRF2, los resultados mostraron que la dieta hiperlipídica de aceite de maíz provocó una disminución de los niveles totales de NRF2 respecto a los otros dos tipos de dieta a día 100. Estos resultados están en línea con los obtenidos en la etapa de la iniciación, donde dicha dieta provocó cambios en este mismo sentido. No obstante, no se observaron cambios en los niveles de retención citoplasmática de NRF2 por efecto del tratamiento dietético a esa edad. Los menores niveles totales de NRF2 podrían sugerir una menor inducción de la defensa antioxidante enzimática debida a la dieta de aceite de maíz. Sin embargo, los resultados de la expresión no apoyan esta hipótesis, ya que como se ha comentado no hubo cambios en la expresión hepática de las enzimas antioxidantes debidos a las dietas. Considerando que la enfermedad cancerosa ya está instaurada en esta etapa, las consecuencias propias del cáncer podrían haber contribuido a que estos efectos no se observaran con claridad. En cualquier caso, tal como ya se discutió ampliamente en el apartado anterior, la

## *Discusión*

disminución de NRF2 asociada a la dieta de aceite de maíz podría haber tenido un papel en la carcinogénesis. El hecho de que dicha disminución se produjera tanto en la iniciación del proceso como en la enfermedad ya establecida va a favor de esta hipótesis y sugiere un efecto diferencial de esta dieta respecto a la de aceite de oliva que se reflejaría en su efecto claramente estimulador de la carcinogénesis mamaria.

Cabe destacar que independientemente de la dieta, los niveles de expresión y de actividad de las enzimas antioxidantes a 100 y 150 días no variaron respecto a los de la iniciación, a excepción de la enzima SOD1. La expresión de esta enzima aumentó a lo largo de la iniciación para luego descender (más o menos la mitad) a 100 días y situarse de nuevo niveles similares a los previos a la inducción con el carcinógeno. Asimismo, al comparar las dos edades entre sí, se observó una tendencia a aumentar la actividad GPX y una disminución de la actividad SOD en todos los grupos, así como un aumento de la expresión de CAT, SOD2 y GR en el grupo de aceite de maíz. Por otro lado, al comparar los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes en los animales inducidos a 100 y 150 con los de los animales sanos a esta misma edad, se observó que en los animales inducidos dichos niveles fueron prácticamente la mitad que los observados en animales sanos y los niveles de actividad iguales o ligeramente inferiores. Ello sugeriría una disminución de la capacidad de inducir la expresión antioxidante en el hígado en los animales inducidos respecto a los sanos, lo cual podría asociarse a un estado de mayor estrés oxidativo en los primeros. Numerosos trabajos han descrito diferencias en el nivel de estrés oxidativo en diversos tejidos de ratas inducidas con DMBA al compararlos con ratas sanas (Anbuselvam et al., 2007; Kumaraguruparan et al., 2007). Este mismo efecto también se ha observado en estudios realizados en humanos (Mannello et al., 2009; Sinha et al., 2009; Yuvaraj et al., 2008). La disminución de la capacidad antioxidante se ha observado además en animales o humanos con cáncer diferente al de mama respecto a un grupo control sano (Sanchez et al., 2006). En cualquier caso, con los datos disponibles no puede determinarse si la menor expresión de las enzimas anitioxidantes es causa o consecuencia del proceso carcinogénico.

En la glándula mamaria, la expresión antioxidante tampoco mostró grandes diferencias por efecto de los lípidos de la dieta, aunque se observaron más cambios que en hígado. Así, la dieta de aceite de maíz aumentó la expresión SOD a 150 días y disminuyó la de GPX1 y GPX4 a 100 y 150 días, respectivamente. En cambio, la dieta

de aceite de oliva se asoció a niveles de expresión similares a los del control. En un estudio previo del grupo investigador desarrollado en otra serie experimental tampoco se detectaron cambios en la expresión de enzimas antioxidantes en la glándula mamaria de animales adultos con cáncer de mama por efecto de los lípidos de la dieta. Es interesante destacar que la pérdida de la expresión antioxidante en hígado no se observó en la glándula mamaria.

El análisis de la defensa antioxidante no enzimática tampoco mostró cambios significativos en los parámetros del glutatión en plasma debidos a los lípidos de la dieta. Esta situación fue distinta a lo ocurrido en la etapa de la iniciación, cuando las dietas hiperlipídicas aumentaron los niveles de GSSG. La ausencia de diferencias en los niveles plasmáticos de glutatión estuvo en línea con los resultados obtenidos en el análisis de la defensa antioxidante enzimática en hígado, especialmente las enzimas del ciclo del glutatión, en las que tampoco se observaron diferencias debidas a los lípidos de la dieta, y podría estar relacionada con el tratamiento dietético a largo plazo. Sin embargo, existen trabajos que demuestran un efecto de los lípidos de la dieta así como de componentes minoritarios de la dieta como polifenoles, sobre los niveles de glutatión (Romieu et al., 2008; Meza-Miranda et al., 2014).

En cambio, independientemente del tipo de dieta, se observó un aumento de los niveles de GSSG de 100 a 150 días y, consecuentemente una disminución de la ratio GSH/GSSG, principal indicador de los niveles de estrés plasmático. Este hecho estaría de acuerdo con la tendencia de la actividad GPX a aumentar entre estas dos edades y sugeriría un aumento de los niveles de estrés oxidativo a 150 días. Estos mayores niveles de estrés se asociarían a una aceleración de la enfermedad cancerosa en todos los grupos experimentales, tal como se halló en el análisis de los parámetros de la carcinogénesis mamaria que se discutirán a continuación. En estos cambios también podría haber cierta influencia de la edad de los animales. En este sentido, existen estudios que demuestran una correlación positiva entre los niveles de GSSG y la edad y una correlación negativa entre los niveles de GSH y la edad (Giustarini et al., 2006). Además, también se ha descrito un *shift* o cambio entre las formas reducidas y oxidadas en plasma al aumentar la edad. Este *shift* consistiría en un cambio general de las formas reducidas, de GSH o grupos tiol de las proteínas, en sus respectivas formas oxidadas, GSSG y proteínas oxidadas o formas disulfuro

## Discusión

(Maher, 2005). Este *shift* tendría un papel importante en numerosas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, artritis y enfermedades neurológicas (Giustarini et al., 2006; Go and Jones, 2005; Samiec et al., 1998). La causa de este cambio general en los grupos tiol es todavía desconocida. Así, se ha hipotetizado que su causa podría ser simplemente el aumento de radicales libres y estrés oxidativo con la edad. Sin embargo, estas diferencias no se observaron en los animales sanos, con lo cual los posibles efectos de la edad requerirían de un análisis más profundo. Por otra parte, también con independencia de los efectos de la dieta, los niveles de los parámetros del glutatión fueron inferiores en animales inducidos a 150 días a los de los animales sanos a esa misma edad, excepto los niveles de GSSG, que fueron superiores. Estos resultados están en línea con lo observado en la expresión de las enzimas antioxidantes hepáticas, en las que se constató una pérdida de la capacidad antioxidante en los animales afectados de cáncer de mama. Sobre el papel del glutatión en el desarrollo del cáncer diversos autores lo definen como un arma de doble filo (Traverso et al., 2013). Así, una estrategia bien conocida contra la progresión tumoral consistiría en el aumento de la capacidad antioxidante del glutatión y sus enzimas relacionadas para aumentar así la defensa antioxidante celular y de esta manera proteger a la célula de posibles mutaciones. Por otro lado, otra estrategia más reciente y cada día más aplicada, consistiría en todo lo contrario, ya que promoviendo la depleción o vaciado del glutatión celular y la inhibición de sus vías de detoxificación relacionadas se sensibiliza a las células para el tratamiento tumoral, haciéndolas menos quimioresistentes (Lushchak, 2012).

Cuando se analizó el daño oxidativo en lípidos, los niveles plasmáticos de MDA mostraron la misma tendencia que en animales sanos y en animales inducidos en la etapa de la iniciación, de manera que la dieta de aceite de maíz aumentó los niveles de peroxidación lipídica en plasma respecto a los otros dos tipos de dietas. Además, los niveles de MDA se mantuvieron en el mismo rango que durante la etapa de la iniciación y tampoco variaron entre los 100 y los 150 días. Como ya se comentó al tratar los efectos en animales sanos (apartado 1 de Resultados), está descrito que las dietas de aceite de maíz pueden provocar un aumento de peroxidación lipídica (Haggag Mel et al., 2014) y que las dietas de aceite de oliva tendrían un efecto protector debido principalmente a sus componentes minoritarios (Kanner et al.,

2012). El papel de la peroxidación lipídica en cáncer es controvertido y tal como ya se ha discutido parece tener un papel dual. Mientras que elevados niveles de daño oxidativo en lípidos tienen un claro efecto negativo para la célula, en diversas situaciones en las que la enfermedad cancerosa está instaurada, estos niveles elevados podrían contribuir bien a la activación de vías apoptóticas (Barrera, 2012), bien a la sensibilización de las células frente al tratamiento quimioterápico (Sturlan et al., 2003). En este trabajo, la mayor peroxidación lipídica debido a la dieta de aceite de maíz se asoció a una mayor carcinogénesis.

En cuanto al análisis del daño oxidativo a nivel de ADN, los resultados no mostraron diferencias en los niveles de 8-OHdG a 150 días debido al tipo de dieta. Esta ausencia de efectos podría deberse a que una vez instaurada la enfermedad cancerosa tendrían una mayor influencia los mecanismos propios del cáncer que los posibles efectos de los lípidos de la dieta. Además, el tratamiento dietético a largo plazo también podría haber contribuido. Por otra parte, independientemente de los efectos de los lípidos de la dieta, los niveles de la base modificada aumentaron respecto a los niveles hallados en la etapa de la iniciación. Este aumento podría deberse al desarrollo de la enfermedad cancerosa en sí. Tal como ya se ha discutido en el apartado anterior, se han descrito unos niveles más elevados de 8-OHdG en tejido mamario sano de mujeres con cáncer de mama que en mujeres sanas (Li et al., 2001). Por otro lado, *Hashimoto* y colaboradores han demostrado un aumento de 8-OHdG en ratas con el aumento de la edad. Estos autores defienden que el aumento de esta base modificada se debe a una menor activación de los mecanismos de reparación, que promueve la acumulación de la base modificada (Hashimoto et al., 2007). Los resultados de este trabajo están en línea con los de estos autores, ya que a 150 días la expresión de los enzimas de reparación OGG y PARP disminuyó respecto a los niveles de la etapa de la iniciación, mientras que el daño oxidativo en el ADN aumentó. Con estos datos podría hipotetizarse que el aumento de daño oxidativo en las ratas adultas tratadas con el carcinógeno sería debido tanto a la enfermedad como al aumento de edad, y que estos mayores niveles de daño también serían consecuencia, al menos en parte, de una menor reparación. Sería interesante determinar la actividad enzimática de las enzimas OGG y PARP en esta misma edad para analizar más profundamente los niveles reales de reparación de estas enzimas.

## Discusión

Finalmente, la última parte del estudio consistió en el análisis de la carcinogénesis mamaria con el objetivo de evaluar los efectos de los lípidos de la dieta en el desarrollo del cáncer y correlacionarlos con los parámetros de estrés oxidativo tanto en la iniciación como en etapas posteriores. El estudio de la carcinogénesis comprendió el análisis morfológico de la glándula mamaria y el de su densidad a 100 días, así como el análisis de los parámetros clínicos.

Para el estudio morfológico de la glándula mamaria de los animales inducidos se categorizaron las diferentes estructuras proliferativas epiteliales: PIDL1, PIDL2, tumores e hiperplasias. Esta clasificación se realizó en base a la establecida por *Russo y Russo* (Russo and Russo, 1996a). Los resultados mostraron que la estructura proliferativa más frecuente en todos los grupos experimentales fueron las PIDL1, seguidas de los tumores, PIDL2 e hiperplasias. En cuanto a los posibles efectos de los lípidos de la dieta, el grupo de la dieta de aceite de maíz mostró un mayor número de estructuras proliferativas (PIDL1, tumores e hiperplasias) que los otros grupos. La dieta de aceite de oliva, en cambio, mostró unos niveles totales de estructuras más cercanos a los del grupo control. Respecto al número de tumores, la dieta de aceite de maíz provocó 1,6 veces más tumores que los otros dos tipos de dieta (48 tumores vs. 29 en el grupo de aceite de oliva y 30 en el control). En la literatura no se han hallado trabajos donde se analicen las microestructuras proliferativas de la glándula inducida con el carcinógeno y el posible efecto de los lípidos de la dieta. El aumento general del número de estructuras proliferativas debido a la dieta de aceite de maíz podría estar relacionado con su efecto sobre la capacidad proliferativa de la glándula mamaria y estaría de acuerdo con el efecto estimulador de dicha dieta en el cáncer de mama experimental, tal como se demostró en este trabajo y en otros previos del grupo (Solanas et al., 2010; Escrich et al., 2004).

Al analizar los efectos de los lípidos de la dieta sobre la densidad de la glándula mamaria no se obtuvieron diferencias significativas. Sin embargo, en los animales sanos se observó que los animales alimentados con dieta de aceite de maíz tendían a presentar una mayor densidad de la glándula mamaria, lo que podría asociarse a una mayor susceptibilidad o riesgo de padecer cáncer de mama. En los animales inducidos no se observó dicha tendencia, probablemente debido a diversos factores metodológicos, como el bajo número de muestras analizadas (n=5) y las características del estudio (contaje en cada campo), que dificultaron el análisis

estadístico de los resultados. Además, existieron otras limitaciones metodológicas, como la exéresis de los tumores macroscópicos durante la necropsia, antes del procesamiento y estudio morfológico de las glándulas. Teniendo en cuenta que el número de tumores en las glándulas del grupo de aceite de maíz fue superior al de los otros dos grupos, este hecho podría haber influido en los resultados, ya que las glándulas de este grupo tuvieron una menor superficie para ser analizadas. Asimismo, es importante recordar que el análisis morfológico de la glándula mamaria mediante la técnica Whole Mount se realizó en la periferia de la glándula, debido a la imposibilidad de estudiar la zona central debido a la densidad mamaria. Todo ello dificultó la caracterización del estado neoplásico real de las glándulas mamarias.

Finalmente se analizaron los parámetros clínicos de la carcinogénesis: tiempo de latencia, incidencia, contenido tumoral y volumen tumoral. El análisis del tiempo de latencia (tiempo medio de latencia y distribución por clases) mostró resultados concordantes entre sí, indicando que la dieta rica en aceite de maíz favoreció la aparición temprana de los adenocarcinomas mamarios, a pesar de que las diferencias observadas entre grupos no fueron estadísticamente significativas. La aparición temprana de la patología mamaria maligna en los grupos alimentados con la dieta rica en PUFA n-6 indicaría una aceleración de la enfermedad cancerosa asociada al consumo de dicha dieta, lo cual es compatible con el efecto estimulador de esta dieta, descrito por el grupo investigador en trabajos previos, así como por otros autores (Cohen et al., 1986b; Sundram et al., 1989; Woutersen et al., 1999; Escrich et al., 2004; Solanas et al., 2010). Este efecto sobre el tiempo de latencia se observó en menor grado en el caso de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra, de manera que los grupos alimentados con dicha dieta mostraron valores intermedios entre los grupos control y de dieta de aceite de maíz. Por tanto, la dieta de aceite de oliva, a pesar de ser también una dieta hiperlipídica, tendría un efecto menor sobre la aceleración de la aparición de los tumores que la dieta rica en aceite de maíz. Por otra parte, cabe mencionar que la falta de significación estadística entre las diferencias observadas en este parámetro podría ser debida a la gran dispersión de los datos y al tamaño muestral, relativamente bajo. Cabe destacar que el diseño experimental fue optimizado con el objetivo de utilizar el menor número de

## *Discusión*

animales posibles con los que obtener la cantidad necesaria de muestras para los estudios biológicos, así como por razones de practicabilidad.

En segundo lugar se analizó la incidencia de afectación. Los resultados mostraron que ésta aumentó en todos los grupos a lo largo del estudio, mostrando en todos ellos un comportamiento similar, con un crecimiento rápido del número de animales afectados en las primeras etapas y una estabilización en las etapas finales. El grupo alimentado con la dieta hiperlipídica de aceite de maíz presentó una incidencia significativamente mayor en comparación con los otros dos grupos a lo largo de todo el ensayo. Estos resultados junto con el menor tiempo de latencia indicarían un efecto estimulador de esta dieta. Por otra parte, el grupo de aceite de oliva presentó una incidencia intermedia entre el grupo de dieta de aceite de maíz y el control. Además, en el momento final del estudio, el porcentaje de animales afectados fue del 100% en los grupos de dietas hiperlipídicas y del 90% en la dieta control. Esta elevada incidencia podría ser debida a la dosis del carcinógeno administrada (10 mg), ya que en series experimentales anteriores del grupo de investigación, en las que se administró una dosis menor (5 mg), la incidencia no llegó a ser tan elevada. La similitud entre la incidencia de los grupos alimentados con dietas hiperlipídicas a partir de la penúltima palpación podría deberse al “enmascaramiento” de los efectos diferenciales de las dos dietas hiperlipídicas, una vez transcurrida la etapa de la iniciación por parte del carcinógeno.

El tercer parámetro analizado fue el contenido tumoral. Éste se estudió a través del contenido medio por animal afectado y del número total de tumores por grupo, para poder obtener una idea integral del parámetro debido a que cada uno de ellos proporciona una información parcial. En el primer caso, el parámetro presenta el inconveniente de verse afectado por la dinámica de aparición de tumores en animales no afectados anteriormente, mientras que en el caso del contenido tumoral total, podrían presentar el mismo valor grupos con distinta incidencia de afectación. Ambos parámetros aumentaron a lo largo de todo el estudio en los tres grupos experimentales. Este aumento fue mayor en el grupo de dieta rica en aceite de maíz, mientras que el grupo de aceite de oliva virgen extra presentó unos valores intermedios entre los grupos de dieta de aceite de maíz y control, siendo este último grupo el que obtuvo los valores más bajos para ambos parámetros. Asimismo, no se observó una saturación de estos parámetros hacia el final del estudio, lo que sugiere

una apropiada combinación entre las dosis de DMBA utilizadas y la duración del ensayo, de manera que no se alcanzó el máximo de posibilidades en cuanto al contenido tumoral. En cambio, en estudios previos del grupo de investigación con dosis de 20 mg/animal sí que se observaron situaciones de saturación (Escrich et al., 1994b). Los resultados de este tercer parámetro estarían en concordancia con los de incidencia y tiempo de latencia lo que reforzaría el ya descrito efecto estimulador de la dieta rica en PUFA n-6 en la carcinogénesis mamaria experimental (Woutersen et al., 1999; Karmali et al., 1989; Escrich, 2006). En cambio, la dieta rica en aceite de oliva virgen ejercería un efecto intermedio o próximo al observado en el grupo de dieta control, a pesar de su alto contenido en lípidos.

El último de los parámetros analizados fue el volumen tumoral. Éste se estudió mediante el volumen total por grupo ( $V$ ), el volumen medio por animal del grupo ( $V_A$ ) y el volumen medio por tumor del grupo ( $V_K$ ). Son parámetros distintos conceptualmente y por ello se requiere de los tres para obtener una información completa del volumen tumoral. El volumen tumoral por animal sería más apropiado para establecer comparaciones entre los resultados obtenidos de los tumores experimentales y los humanos dado que en los animales existen seis pares de glándulas mamarias a diferencia de la glándula única de los humanos. El volumen por tumor permitiría comparar dentro del propio modelo experimental. Finalmente, el volumen tumoral total no tendría ningún significado práctico ni intuitivo pero complementaría la información proporcionada por los otros dos parámetros. Además, éste último, al no estar influenciado por la incidencia de afectación, no presenta sus problemas. Tal como sucedió con otros parámetros, en general el volumen tumoral aumentó a lo largo del estudio. Al estudiar el volumen tumoral total, se observó que los animales del grupo control presentaron valores de volúmenes inferiores a los otros dos grupos, mientras que en los grupos de las dietas hiperlipídicas los tumores parecieron ser de mayor tamaño. Al analizar el volumen tumoral con respecto al número de animales afectados, se pudo observar que en los grupos en los que la incidencia fue mayor, aquellos alimentados con la dieta rica en aceite de maíz, este parámetro puede verse disminuido con respecto al valor de los otros grupos experimentales. Del mismo modo, cuando el número de tumores también es superior en uno de los grupos con respecto a los otros, posiblemente debido a la aparición de nuevos tumores de pequeño tamaño, los valores de

## *Discusión*

volumen medio por tumor también podrían verse disminuidos, como sucedió en la dieta rica en aceite de maíz. A pesar de que los valores de volumen de los grupos de dieta rica en aceite de oliva virgen extra presentaron valores superiores a los del grupo control, e incluso en algunos casos superiores a los de la dieta de aceite de maíz, los estudios anatomopatológicos realizados por este grupo de investigación en estudios previos han demostrado la menor malignidad de los tumores mamarios de los animales de la dieta de aceite de oliva comparado con los tumores de los animales alimentados con la dieta de aceite de maíz. Además, estas características anatomopatológicas son similares a las de los tumores del grupo control (Costa et al., 2002).

En resumen, los parámetros clínicos de la carcinogénesis estudiados demostraron un efecto estimulador de la dieta hiperlipídica de aceite de maíz, mientras que en el caso de la dieta rica en aceite de oliva virgen extra los resultados mostraron unos efectos intermedios entre las dietas de aceite de maíz y la control. El efecto estimulador de las dietas ricas en PUFA n-6 sobre la carcinogénesis ya ha sido ampliamente descrito (Ip, 1987; Bartsch et al., 1999; Solanas, 2000; Stoll, 2002). En cambio, existen resultados contradictorios sobre el efecto del aceite de oliva en cáncer, habiéndose descrito desde un efecto protector (Solanas et al., 2002b; Costa et al., 2004; Escrich, 2006), hasta uno débilmente promotor o una falta de efecto (Fay et al., 1997; Lee and Lin, 2000; la Vecchia et al., 1995; Stark and Madar, 2002; Sieri et al., 2008).

En líneas generales, se podría afirmar que los lípidos de la dieta ejercieron un efecto modulador diferencial sobre la carcinogénesis mamaria experimental y que estos podrían deberse, al menos en parte, a sus efectos también diferenciales sobre el estrés oxidativo, tanto al aumentar el riesgo de la enfermedad en el animal sano, como durante la propia carcinogénesis, especialmente en la ventana de la iniciación.

## 4. DISCUSIÓN INTEGRADA

Los lípidos de la dieta constituyen los nutrientes que se han relacionado más directamente con el cáncer de mama. Sus efectos moduladores no sólo dependen de la cantidad sino también del tipo de grasas y del periodo de su administración. Las dietas ricas en PUFA n-6, como las basadas en aceites de semillas como el aceite de maíz, ejercen un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria. El papel de las dietas ricas en MUFA n-9, como el aceite de oliva virgen, que además contiene multitud de compuestos minoritarios antioxidantes, es más controvertido. A pesar de que existen abundantes evidencias epidemiológicas y experimentales de su potencial efecto protector y quimiopreventivo, existen también resultados discordantes en la literatura, habiéndose descrito desde falta de efecto hasta un efecto débilmente estimulador. Por otra parte, los efectos moduladores de los lípidos de la dieta parecen ejercerse fundamentalmente durante la etapa de la promoción de la carcinogénesis. Sin embargo, también se ha sugerido su posible papel durante la iniciación de dicho proceso. En trabajos previos del grupo investigador desarrollados en series experimentales anteriores se había constatado un efecto diferencial de las dietas según si su administración se producía desde antes de la inducción con el carcinógeno DMBA, justo después del destete de los animales, o a partir de ésta (Solanas, 2000; Escrich et al., 2001; Solanas et al., 2001; Moral et al., 2003). Más recientemente, en la misma serie experimental en la que se ha llevado a cabo el presente estudio se ha podido constatar que, efectivamente, el efecto modulador de los lípidos de la dieta en el cáncer de mama experimental también implica su influencia sobre los procesos de metabolización de xenobióticos en el hígado, y consecuentemente, sobre los niveles plasmáticos de metabolitos reactivos y de daño genotóxico en la glándula mamaria (Manzanares, 2016). En el presente trabajo se quiso abordar el papel del estrés oxidativo en los efectos moduladores de los lípidos de la dieta.

En primer lugar, y en relación al análisis de la evolución ponderal y de la masa corporal, cabe destacar que la reproducibilidad de los resultados obtenidos en este trabajo con los de series anteriormente desarrolladas en el laboratorio demuestra la idoneidad de las dietas experimentales utilizadas y pone en evidencia que en el control y el mantenimiento del peso corporal no sólo interviene la cantidad de grasa

## *Discusión*

consumida sino también el tipo. En este sentido, la dieta rica en aceite de maíz aumentó el peso corporal y el grado de adiposidad de los animales sanos a lo largo de todo el estudio, mientras que la dieta rica en aceite de oliva presentó pesos similares a los del grupo control. Resultados previos demostraron que ambas dietas tienen un efecto diferencial sobre el destino metabólico de las grasas. En el caso de la dieta de aceite de oliva, dicho efecto diferencial probablemente esté mediado, al menos en parte, por la oleiletanolamida, un metabolito del ácido oleico, y su diana molecular UCP-2 (Fu et al., 2005; Fu et al., 2007). Dado que el aumento de adiposidad y la propia obesidad se consideran un factor de riesgo en cáncer de mama en la población humana (WCRF/AICR, 2007), el hecho de que la dieta de aceite de maíz aumente el peso corporal en comparación con la dieta de aceite de oliva y la control, supondría un riesgo incrementado frente al cáncer. Entre otros motivos, cabría destacar el hecho de que el tejido adiposo es un lugar de bioacumulación de compuestos potencialmente peligrosos (Irigaray et al., 2007). Por otra parte, también cabe destacar que en los animales inducidos con el carcinógeno, las diferencias de pesos debidas a las dietas fueron inferiores que las observadas en los animales sanos, efecto ya descrito por el grupo investigador (Moral et al., 2004).

Está descrito que la dieta puede modificar el estado oxidativo celular. 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 Se y los antioxidantes tiol, entre otros. Diversos estudios han demostrado los efectos sobre el estado redox de la célula de compuestos como los polifenoles del té negro, la fibra y sobretodo los diferentes tipos de ácidos grasos (Watson et al., 2000; Murugan et al., 2007). Por otra parte, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren la contribución del estrés oxidativo en un amplio rango de enfermedades y, en particular, en cáncer. Sin embargo, el papel del estrés oxidativo en cáncer es controvertido. Mientras que algunos estudios demuestran un efecto beneficioso del aumento de las defensas antioxidantes, otros no muestran ningún efecto, o incluso han descrito efectos perjudiciales para la salud (Zhang et al., 2008; Sesso et al., 2008). Estas contradicciones han dado lugar a la llamada “paradoja del estrés oxidativo”. Brevemente, dicha paradoja consistiría en el doble papel que juega el estrés oxidativo en la carcinogénesis. Así, una disminución de las defensas

antioxidantes o unos elevados niveles de estrés podrían ser perjudiciales, ya que aumentarían el riesgo celular a nuevas mutaciones, o bien, en ocasiones podrían ser beneficiosos, llevando a la célula a la apoptosis (Biswas, 2016; Halliwell, 2000; Halliwell, 2013; Reuter et al., 2010). Con el objetivo de profundizar y clarificar los efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo y su influencia en la carcinogénesis mamaria, se analizó la expresión y actividad hepáticas de las principales enzimas antioxidantes, así como del factor de transcripción NRF2, en animales sanos alimentados con dietas ricas en aceite de maíz o de oliva virgen extra, en comparación a una dieta control. En general, los resultados mostraron que las dietas hiperlipídicas administradas desde el destete se asociaron a unos mayores niveles de estrés oxidativo respecto a la dieta control, siendo dicho efecto más importante para la dieta de aceite de maíz. Así, las dietas hiperlipídicas, tendieron a aumentar la expresión y actividad GPX hepáticas y en menor medida en glándula mamaria. Además, la dieta de aceite de maíz tendió a disminuir la expresión GR. Estos cambios se asociaron a una tendencia al aumento de los niveles de GSSG por efecto de las dietas hiperlipídicas y a un aumento del MDA por efecto de la dieta de aceite de maíz. En consecuencia, el consumo de dietas ricas en grasas, especialmente de PUFA n-6, desde antes de la pubertad y a lo largo de toda a vida, podría estar aumentando el riesgo de sufrir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y, más en concreto, de desarrollar cáncer tras la exposición a agentes carcinógenos. El mayor daño oxidativo en el ADN observado justo antes de la administración del carcinógeno en los animales alimentados con dichas dietas va a favor de esta hipótesis. El daño en ADN, proteínas y lípidos inducido por ROS juega un papel muy importante en el desarrollo y la progresión de numerosos procesos patológicos incluido el cáncer. En concreto, el daño oxidativo en el material genómico puede resultar en una parada o estimulación del proceso de replicación, inducción de vías de transducción de señales, errores en la replicación o inestabilidad genómica (Cooke et al., 2003). Estas lesiones pueden ser reparadas o fijarse como mutaciones en el ADN colaborando así en la transformación de una célula sana en tumoral. Además, 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 y la apoptosis (Zmijewski et al., 2005; Chiarugi and Fiaschi, 2007). El aumento

## *Discusión*

de estrés oxidativo asociado a las dietas hiperlipídicas, especialmente de aceite de maíz, en animales sanos podría suponer un estrés oxidativo añadido al causado por el propio carcinógeno. Por todo ello, se decidió estudiar el efecto de los lípidos de la dieta en el estrés oxidativo durante la iniciación de la carcinogénesis inducida con DMBA.

Los resultados de la etapa de la iniciación mostraron que, en línea con lo ocurrido en animales sanos, durante dicha etapa las dietas hiperlipídicas también se asociaban a un mayor estrés oxidativo al aumentar la expresión y actividad de GPX y disminuir la expresión GR en hígado, y aumentar los niveles plasmáticos de GSSG. Nuevamente, los efectos de la dieta rica en aceite de maíz fueron mayores, como reflejaron los mayores niveles de peroxidación lipídica y la menor actividad GR justo antes del carcinógeno. En la glándula mamaria, en cambio, las dietas hiperlipídicas, y en especial la dieta de aceite de oliva, tendieron a disminuir la defensa antioxidante. Este hecho, en principio, podría parecer contradictorio con lo ocurrido en hígado, sin embargo cabría considerar que los mecanismos por los cuales las células diana del carcinógeno “se defienden” del insulto oxidativo tras la administración de éste así como la propia influencia de la dieta podrían ser diferentes. Así, los niveles de daño oxidativo en el ADN en dicha glándula tras la administración del carcinógeno también fueron mayores por efecto de las dietas hiperlipídicas, pero sobre todo de la de aceite de oliva. Todo ello implicaría, por una parte, un mayor nivel de estrés oxidativo en la glándula mamaria de los animales alimentados con las dietas hiperlipídicas respecto al control y, por otro, que dicho estrés sería mayor por efecto de la dieta rica en aceite de oliva. Teniendo en cuenta el efecto pro-apoptótico previamente demostrado de esta dieta, podría hipotetizarse que la inducción de la apoptosis de las células iniciadas podría ser uno de los mecanismos de la acción moduladora de esta dieta.

Los resultados del análisis de los parámetros clínicos de la carcinogénesis confirmaron los efectos moduladores diferenciales de las dietas ricas en PUFA n-6 y en aceite de oliva virgen en la carcinogénesis mamaria experimental y apoyaron la hipótesis de que éstos podrían ejercerse, al menos en parte, durante la etapa de la iniciación a través de la modulación diferencial del estrés oxidativo. Así, los lípidos de la dieta no tuvieron prácticamente efectos sobre los parámetros de estrés oxidativo en los animales adultos enfermos de cáncer de mama, ya sea porqué a

largo plazo los efectos del tratamiento dietético no se mantienen o porqué una vez la enfermedad cancerosa está establecida los posibles efectos de los factores nutricionales quedan enmascarados total o parcialmente. Además, cabe destacar que en estos animales se observó una cierta disminución de la capacidad antioxidante en hígado y plasma respecto a los animales sanos, en línea con lo descrito por otros autores (Sanchez et al., 2006). Por tanto, los resultados de este trabajo indicarían que la etapa de la iniciación de la carcinogénesis mamaria es especialmente sensible a la acción moduladora de los lípidos de la dieta. En este sentido, las dietas ricas en PUFA n-6, a través de sus efectos sobre el estrés oxidativo, y posiblemente también otros mecanismos, aumentarían la susceptibilidad de la glándula mamaria al desarrollo del cáncer inducido por un carcinógeno químico como el DMBA, ejerciendo por tanto un claro efecto estimulador del cáncer de mama. La disminución de NRF2 inducida por esta dieta podría jugar un papel en este efecto modulador, incluso más allá del estrés oxidativo. En cambio, el efecto débilmente estimulador observado para la dieta rica en aceite de oliva se realizaría, al menos en parte, a través de unos niveles de estrés oxidativo intermedios entre los inducidos por la dieta de aceite de maíz y la control a nivel hepático y generalmente superiores en el tejido diana. Cabe destacar que este efecto diferencial de ambas dietas no sólo se ejerce sobre el comportamiento clínico de los tumores sino también sobre sus características histopatológicas. Así, estudios previos del grupo han demostrado que los adenocarcinomas mamaros de los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva son de menor grado de malignidad que los de los animales alimentados con la dieta de aceite de maíz, siendo más parecidos a los del grupo control (Costa et al., 2002). La particular composición del aceite de oliva virgen, con su alto contenido en MUFA n-9, su menor contenido en PUFA n-6 y su riqueza en compuestos bioactivos, sería responsable de estos efectos diferenciales sobre la carcinogénesis mamaria. El hecho de utilizar dietas hiperlipídicas podría explicar su efecto débilmente estimulador. En este sentido, sería de gran interés investigar si una dieta normolipídica de aceite de oliva virgen ejercería un efecto protector.

Finalmente, cabe mencionar que la extrapolación de los resultados obtenidos en trabajos con modelos animales a humanos debe realizarse con precaución. Por otra parte, teniendo en cuenta que los efectos de algunos compuestos pueden llegar a ser

## *Discusión*

opuestos, quimiopreventivos o estimuladores, según las condiciones experimentales, resulta esencial ser cauto a la hora de utilizar la información derivada de la experimentación para recomendar determinados regímenes quimiopreventivos según si se trata de la población general, individuos con alto riesgo de cáncer o individuos con la enfermedad.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES**

BIBLIOGRAFÍA



**1. Del estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal y el estrés oxidativo en animales sanos:**

- 1.1. Las dietas experimentales permitieron el crecimiento normal de los animales no inducidos del estudio.
- 1.2. Los animales alimentados con la dieta de aceite de maíz mostraron un aumento significativo del peso corporal así como del IMC. En cambio, los animales alimentados con la dieta de aceite de oliva presentaron unos valores similares al grupo control en ambos parámetros.
- 1.3. La enzima antioxidante de expresión mayoritaria tanto en hígado como en glándula mamaria fue CAT, seguida de GPX1, SOD1 o GPX4, SOD2 y finalmente GR. Este orden de magnitud se mantuvo en todas las edades estudiadas y no se modificó por efecto de los lípidos de la dieta.
- 1.4. En general, las dietas hiperlipídicas aumentaron la expresión y la actividad GPX en hígado. Dicho efecto fue más importante en el caso de la dieta de aceite de maíz, la cual, además, tendió a disminuir la expresión de GR respecto a las otras dos dietas a lo largo de todo el ensayo, sugiriendo unos mayores niveles de estrés oxidativo por efecto de esta dieta.
- 1.5. La dieta de aceite de maíz tendió a disminuir los niveles totales del factor de transcripción NRF2 en hígado respecto a la dieta control. Dicho efecto no se observó en el caso de la dieta de aceite de oliva.
- 1.6. La influencia de las dietas hiperlipídicas sobre la expresión antioxidante en la glándula mamaria fue menor que en tejido hepático, observándose únicamente una tendencia a aumentar la expresión de GPX1 por parte de la dieta de aceite de maíz, al igual que ocurrió en hígado.
- 1.7. Las dietas hiperlipídicas se asociaron a mayores niveles plasmáticos de la forma oxidada de glutatión, el GSSG.
- 1.8. La dieta de aceite de maíz tendió a mostrar unos niveles plasmáticos de MDA superiores respecto a las otras dos dietas a lo largo del tiempo sugiriendo una mayor peroxidación lipídica y, por tanto, un mayor estrés oxidativo.

**2. Del estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre el estrés oxidativo en la iniciación de la carcinogénesis mamaria:**

- 2.1. Las dietas hiperlipídicas aumentaron la expresión y actividad GPX y disminuyeron la expresión de GR en hígado durante la etapa de la iniciación. Además, la dieta de aceite de maíz disminuyó la actividad GR 24 horas antes de la administración del carcinógeno. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los animales sanos y sugieren unos mayores niveles de estrés causados por las dietas hiperlipídicas.
- 2.2. La dieta de aceite de maíz disminuyó tanto los niveles totales de NRF2 como su activación en hígado respecto a la dieta de aceite de oliva y la control, que mostraron niveles similares entre sí.
- 2.3. Independientemente del tipo de dieta, 12 horas después de la administración del carcinógeno disminuyó la expresión hepática de CAT y GPX. Esta disminución se asoció a una disminución de los niveles totales de NRF2 y a un aumento de su retención citoplasmática.
- 2.4. En la glándula mamaria las dietas hiperlipídicas y, en especial, la dieta de aceite de oliva provocaron una disminución generalizada de la expresión de las enzimas antioxidantes, lo cual podría asociarse en el órgano diana del carcinógeno a unos mayores niveles de estrés.
- 2.5. Las dietas hiperlipídicas en general se asociaron a una disminución de las ratios GSH/GSSG y GSH/GSH<sub>total</sub> y unos mayores niveles de GSSG, lo cual estaría de acuerdo con el aumento de actividad GPX y la disminución de la expresión de GR observados en hígado.
- 2.6. Independientemente del tipo de dieta, 12 horas después de la administración del carcinógeno se produjo una disminución de los niveles totales de glutatión, de GSH y de GSSG. Estos cambios no se asociaron a cambios en la expresión de GSS, una de las enzimas implicadas en la síntesis de glutatión.
- 2.7. La dieta de maíz se asoció a un aumento de los niveles plasmáticos de MDA respecto a las otras dos dietas, sugiriendo un aumento de peroxidación lipídica por parte de esta dieta y, por tanto, un mayor nivel de estrés.

## *Conclusiones*

- 2.8. Las dietas hiperlipídicas, y de manera significativa la dieta de aceite de maíz, provocaron un aumento del daño oxidativo en las proteínas plasmáticas 24 horas antes de la administración del carcinógeno.
- 2.9. Las dietas hiperlipídicas aumentaron los niveles del marcador de daño oxidativo en el ADN, 8-OHdG, en glándula mamaria, tanto antes como después de la administración del carcinógeno. Ambas dietas aumentaron la expresión en este tejido de las enzimas de reparación OGG, y la dieta de aceite de maíz también de PARP. En el caso de la dieta de aceite de oliva, el aumento de daño en el ADN fue relativamente mayor que en el de la dieta de aceite de maíz. Ello estaría de acuerdo con la menor expresión de las enzimas antioxidantes inducida por dicha dieta en este tejido y podría asociarse al efecto pro-apoptótico previamente demostrado.
- 2.10. Independientemente del tipo de dieta, los niveles de daño oxidativo en el ADN de la glándula mamaria aumentaron tras la inducción con el carcinógeno, probablemente como consecuencia del efecto de la producción hepática de metabolitos reactivos del DMBA.

### **3. Del estudio de los efectos de los lípidos de la dieta sobre la evolución ponderal, la carcinogénesis mamaria y el estrés oxidativo en animales inducidos con el carcinógeno:**

- 3.1. Las dietas experimentales permitieron el crecimiento normal de los animales inducidos del estudio.
- 3.2. Los animales alimentados con la dieta de aceite de maíz mostraron un aumento del peso corporal así como del Índice de Lee. En cambio, la dieta de aceite de oliva no modificó el peso corporal aunque se asoció a un aumento de la masa corporal respecto al control.
- 3.3. Los lípidos de la dieta tuvieron una influencia menor sobre la defensa antioxidante enzimática a nivel hepático a 100 y 150 días respecto al periodo de la iniciación de la carcinogénesis.
- 3.4. La dieta de aceite de maíz disminuyó los niveles totales hepáticos del factor de transcripción NRF2 respecto a los otros dos tipos de dietas a día 100, del mismo modo que en animales sanos y durante el periodo de la iniciación.

- Ello sugiere que dicha disminución podría jugar un papel en el efecto estimulador de esta dieta en la carcinogénesis mamaria.
- 3.5. Independientemente del tipo de dieta, se observó una tendencia a aumentar la actividad GPX y una disminución de la actividad SOD en el hígado de los animales a 150 días respecto a 100 días. Además, la dieta de aceite de maíz provocó un aumento de la expresión de CAT, SOD2 y GR.
  - 3.6. Los animales inducidos mostraron unos niveles de expresión de las enzimas antioxidantes en hígado a 100 y 150 días inferiores a los de los animales sanos a esa misma edad, sugiriendo una menor capacidad antioxidante en los primeros.
  - 3.7. En la glándula mamaria, la dieta de aceite de maíz aumentó la expresión de SOD1 y disminuyó la de GPX, mientras que la dieta de aceite de oliva mostró unos niveles similares al control. En este tejido no se observó la pérdida de la capacidad antioxidante del hígado.
  - 3.8. Los lípidos de la dieta no afectaron la defensa antioxidante no enzimática, lo cual podría estar relacionado, al menos en parte, con el tratamiento dietético a largo plazo.
  - 3.9. Independientemente del tipo de dieta, los niveles de GSSG aumentaron de 100 a 150 días. Además, todos los parámetros de glutatión a 150 días disminuyeron respecto a los de los animales sanos, excepto el GSSG que aumentó. Ello estaría de acuerdo con la menor expresión antioxidante en el hígado de estos animales y sugeriría unos mayores niveles de estrés respecto a los sanos.
  - 3.10. Independientemente del tipo de dieta, los niveles de GSSG aumentaron de 100 a 150 días. Además, todos los parámetros de glutatión a 150 días disminuyeron respecto a los de los animales sanos, excepto el GSSG que aumentó. Ello estaría de acuerdo con la menor expresión antioxidante en el hígado de estos animales y sugeriría unos mayores niveles de estrés respecto a los sanos.
  - 3.11. La dieta de aceite de maíz aumentó los niveles plasmáticos de MDA, al igual que en los animales sanos y en los inducidos durante la etapa de la

## *Conclusiones*

iniciación, sugiriendo unos mayores niveles de peroxidación lipídica por efecto de dicha dieta.

- 3.12. Los lípidos de la dieta no modificaron los niveles de daño oxidativo en el ADN de glándula mamaria en los animales afectados de cáncer de mama. Además, los niveles de 8-OHdG aumentaron a 150 días respecto a los de la iniciación en todos los grupos experimentales.
- 3.13. Independientemente del tipo de dieta, los niveles de expresión de las enzimas de reparación disminuyeron respecto a los de la iniciación, lo cual se asociaría con los mayores niveles de daño oxidativo.
- 3.14. La estructura proliferativa más frecuente de la glándula mamaria fueron las PIDL1, seguida de tumores, PIDL2 e hiperplasias. La dieta de aceite de maíz se asoció a un mayor número de PIDL1, tumores e hiperplasias que las otras dietas, mientras que la dieta de aceite de oliva mostró unos niveles totales de estructuras más cercanos a los del grupo control. La dieta de aceite de maíz, además, aumentó la densidad de las glándulas mamarias de los animales sanos. En los animales inducidos no se observó dicho efecto.
- 3.15. La dieta de aceite de maíz tuvo un efecto estimulador de la carcinogénesis mamaria, asociándose a menor tiempo de latencia, y mayores incidencia de afectación, contenido tumoral (medio por animal y total) y, en general, volumen tumoral. En cambio, la dieta de aceite de oliva, a pesar de ser también hiperlipídica, mostró un efecto débilmente estimulador, con valores de tiempo de latencia, incidencia y contenido tumoral intermedios entre los de la dieta de aceite de maíz y la control.

**ÍNDICE**

**INTRODUCCIÓN**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**RESULTADOS**

**DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFÍA**



- ABDEL-WAHAB, B. A.,AL-QAHTANI, J. M. & EL-SAFETY, S. A. 2015. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in large doses attenuate seizures, cognitive impairment, and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Neurosci Lett*, 584, 173-7.
- ABED, D. A.,GOLDSTEIN, M.,ALBANYAN, H.,JIN, H. & HU, L. 2015. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B*, 5, 285-99.
- ABEL, S.,DE KOCK, M.,SMUTS, C. M.,DE VILLIERS, C.,SWANEVELDER, S. & GELDERBLUM, W. C. 2004. Dietary modulation of fatty acid profiles and oxidative status of rat hepatocyte nodules: effect of different n-6/n-3 fatty acid ratios. *Lipids*, 39, 963-76.
- ADLERCREUTZ, H. 2003. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83, 113-18.
- AHIMA, R. S. 2006. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*, 14 Suppl 5, 242S-249S.
- ALBI, E. & VIOLA MAGNI, M. P. 2004. The role of intranuclear lipids. *Biol Cell*, 96, 657-67.
- ALTMAN, N. H. G., D.G. 1979. Neoplastic diseases. The laboratory rat, I, 333-76.
- ANBUSELVAM, C.,VIJAYAVEL, K. & BALASUBRAMANIAN, M. P. 2007. 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*, 168, 229-36.
- ANDERSON, D. 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*, 350, 103-8.
- APPLEMAN, D.,SKAVINSKI, E. R. & STEIN, A. M. 1950. Catalase studies on normal and cancerous rats. *Cancer Res*, 10, 498-505.
- ARITA, Y.,KIHARA, S.,OUCHI, N.,TAKAHASHI, M.,MAEDA, K.,MIYAGAWA, J.,HOTTA, K.,SHIMOMURA, I.,NAKAMURA, T.,MIYAOKA, K.,KURIYAMA, H.,NISHIDA, M.,YAMASHITA, S.,OKUBO, K.,MATSUBARA, K.,MURAGUCHI, M.,OHMOTO, Y.,FUNAHASHI, T. & MATSUZAWA, Y. 2012. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. *Biochem Biophys Res Commun*, 425, 560-4.
- ARMSTRONG, B. & DOLL, R. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*, 15, 617-31.
- ARTANDI, S. E. & DEPINHO, R. A. 2010. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31, 9-18.
- ARTHUR, J. R. 2000. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1825-35.
- AUBERT, M. L.,PIERROZ, D. D.,GRUAZ, N. M.,D'ALLES, V.,VUAGNAT, B. A.,PRALONG, F. P.,BLUM, W. F. & SIZONENKO, P. C. 1998. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. *Mol Cell Endocrinol*, 140, 107-13.
- AUNE, D.,CHAN, D. S.,VIEIRA, A. R.,NAVARRO ROSENBLATT, D. A.,VIEIRA, R.,GREENWOOD, D. C. & NORAT, T. 2012. Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*, 96, 356-73.
- AYALA, A.,MUNOZ, M. F. & ARGUELLES, S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438.
- AYLSWORTH, C. F.,JONE, C.,TOSKO, J. E.,MEITES, J. & WELSCH, C. W. 1984. Promotion of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis by high dietary fat in the rat: possible role of intercellular communication. *J Natl Cancer Inst*, 72, 637-45.

- AYLSWORTH, C. F., WELSCH, C. W., KABARA, J. J. & TROSKO, J. E. 1987. Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat. *Lipids*, 22, 445-54.
- AZZI, A., GYSIN, R., KEMPNA, P., MUNTEANU, A., VILLACORTA, L., VISARIUS, T. & ZINGG, J. M. 2004. Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol Chem*, 385, 585-91.
- AZZOPARDI, J. G., CHEPICK, O. F., HARTMANN, W. H., JAFAREY, N. A., LLOMBART-BOSCH, A., OZZELLO, L., RILKE, F., SASANO, N., SOBIN, L. H., SOMMERS, S. C., STALSBERG, H., SUGAR, J. & WILLIAMS, A. O. 1982. The World Health Organization Histological Typing of Breast Tumors—Second Edition. *American Journal of Clinical Pathology*, 78, 806-816.
- BANNI, S., ANGIONI, E., CASU, V., MELIS, M. P., CARTA, G., CORONGIU, F. P., THOMPSON, H. & IP, C. 1999. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*, 20, 1019-24.
- BARRERA, G. 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*, 2012, 137289.
- BARTSCH, H., NAIR, J. & OWEN, R. W. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 20, 2209-18.
- BARTSCH, H., NAIR, J. & OWEN, R. W. 2002. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem*, 383, 915-21.
- BATTISTONI, A., FOLCARELLI, S., CERVONI, L., POLIZIO, F., DESIDERI, A., GIARTOSIO, A. & ROTILIO, G. 1998. Role of the dimeric structure in Cu,Zn superoxide dismutase. pH-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 273, 5655-61.
- BECKS, L., PRINCE, M., BURSON, H., CHRISTOPHE, C., BROADWAY, M., ITOH, K., YAMAMOTO, M., MATHIS, M., ORCHARD, E., SHI, R., MCLARTY, J., PRUITT, K., ZHANG, S. & KLEINER-HANCOCK, H. E. 2010. Aggressive mammary carcinoma progression in Nrf2 knockout mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *BMC Cancer*, 10, 540.
- BEGARA-MORALES, J. C., SANCHEZ-CALVO, B., CHAKI, M., VALDERRAMA, R., MATA-PEREZ, C., PADILLA, M. N., CORPAS, F. J. & BARROSO, J. B. 2016. Antioxidant Systems are Regulated by Nitric Oxide-Mediated Post-translational Modifications (NO-PTMs). *Front Plant Sci*, 7, 152.
- BEGIN, M. E., ELLS, G. & HORROBIN, D. F. 1988. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. *J Natl Cancer Inst*, 80, 188-94.
- BEHREND, L., HENDERSON, G. & ZWACKA, R. M. 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans*, 31, 1441-4.
- BELCHETZ, P. E., PLANT, T. M., NAKAI, Y., KEOGH, E. J. & KNOBIL, E. 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science*, 202, 631-3.
- BELPOMME, D., IRIGARAY, P., HARDELL, L., CLAPP, R., MONTAGNIER, L., EPSTEIN, S. & SASCO, A. J. 2007. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res*, 105, 414-29.
- BENAUD, C., DICKSON, R. B. & THOMPSON, E. W. 1998. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 50, 97-116.
- BENIRSCHKE, K. G., F. M.; JONES, T. C. 1978. *Pathology of Laboratory Animals*. Springer, I.
- BENZIE, I. F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*, 47, 233-61.

- BERGER, S. J., GOSKY, D., ZBOROWSKA, E., WILLSON, J. K. & BERGER, N. A. 1994. Sensitive enzymatic cycling assay for glutathione: measurements of glutathione content and its modulation by buthionine sulfoximine in vivo and in vitro in human colon cancer. *Cancer Res*, 54, 4077-83.
- BERNARD-GALLON, D. J., VISSAC-SABATIER, C., ANTOINE-VINCENT, D., RIO, P. G., MAURIZIS, J. C., FUSTIER, P. & BIGNON, Y. J. 2002. Differential effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on BRCA1 and BRCA2 gene expression in breast cell lines. *Br J Nutr*, 87, 281-9.
- BICKEL, P. E., SCHERER, P. E., SCHNITZER, J. E., OH, P., LISANTI, M. P. & LODISH, H. F. 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*, 272, 13793-802.
- BIECHE, I., CHAMPEME, M. H. & LIDEREAU, R. 1994. A tumor suppressor gene on chromosome 1p32-pter controls the amplification of MYC family genes in breast cancer. *Cancer Res*, 54, 4274-6.
- BINDEA, G., MLECNIK, B., FRIDMAN, W. H., PAGES, F. & GALON, J. 2010. Natural immunity to cancer in humans. *Current Opinion in Immunology*, 22, 215-222.
- BINGHAM, S. A., LUBEN, R., WELCH, A., WAREHAM, N., KHAW, K. T. & DAY, N. 2003. Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet*, 362, 212-4.
- BIRKENFELD, A. & KASE, N. G. 1994. Functional anatomy and physiology of the female breast. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 21, 433-44.
- BIRT, D. F., KRIS, E. S., CHOE, M. & PELLING, J. C. 1992. Dietary energy and fat effects on tumor promotion. *Cancer Res*, 52, 2035s-2039s.
- BISWAS, S. K. 2016. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5698931.
- BJELAKOVIC, G., NIKOLOVA, D., GLUUD, L. L., SIMONETTI, R. G. & GLUUD, C. 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 297, 842-57.
- BJORNSTEDT, M., XUE, J., HUANG, W., AKESSON, B. & HOLMGREN, A. 1994. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 269, 29382-4.
- BLAKE, W. L. & CLARKE, S. D. 1990. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J Nutr*, 120, 1727-9.
- BORRAS, C., SASTRE, J., GARCIA-SALA, D., LLORET, A., PALLARDO, F. V. & VINA, J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*, 34, 546-52.
- BORRAS, J., AMEIJIDE, A., VILARDELL, L., VALLS, J., MARCOS-GRAGERA, R. & IZQUIERDO, A. 2008a. [Trends in cancer incidence in Catalonia, 1985-2002]. *Med Clin (Barc)*, 131 Suppl 1, 11-8.
- BORRAS, J., MARCOS-GRAGERA, R., TORRES, A. & ESPINAS, J. A. 2008b. [Analysis of cancer incidence, survival and mortality according to the main tumoral localizations, 1985-2019: prostate cancer]. *Med Clin (Barc)*, 131 Suppl 1, 63-6.
- BORRÁS, J. M. B., J.; VILADIU, P.; BOSCH, F.X. 1992. Epidemiología y prevenció del càncer a Catalunya (1975-1992). *Insititut Catala d'oncologia*.
- BORRELLI, F. & IZZO, A. A. 2009. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23, 33-49.
- BOTHA, J. L., BRAY, F., SANKILA, R. & PARKIN, D. M. 2003. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer*, 39, 1718-29.

- BOUGNOUX, P.,GIRAUDEAU, B. & COUET, C. 2006. Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 416-21.
- BOYAPATI, S. M.,SHU, X. O.,GAO, Y. T.,DAI, Q.,YU, H.,CHENG, J. R.,JIN, F. & ZHENG, W. 2004. Correlation of blood sex steroid hormones with body size, body fat distribution, and other known risk factors for breast cancer in post-menopausal Chinese women. *Cancer Causes Control*, 15, 305-11.
- BRAY, F.,MCCARRON, P. & PARKIN, D. M. 2004. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res*, 6, 229-39.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27, 951-65.
- BRILL, M. J.,DIEPSTRATEN, J.,VAN RONGEN, A.,VAN KRALINGEN, S.,VAN DEN ANKER, J. N. & KNIBBE, C. A. 2012. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clin Pharmacokinet*, 51, 277-304.
- BRODY, J. G. & RUDEL, R. A. 2003. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect*, 111, 1007-19.
- BROWN, D. A. & LONDON, E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 17221-17224.
- BROWN, N. M. & LAMARTINIERE, C. A. 1995. Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat. *Environ Health Perspect*, 103, 708-13.
- BURN, P. 1988. Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 13, 79-83.
- BUSBEE, P. B.,ROUSE, M.,NAGARKATTI, M. & NAGARKATTI, P. S. 2013. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev*, 71, 353-69.
- BUSTAMANTE, J.,LODGE, J. K.,MARCOCCHI, L.,TRITSCHLER, H. J.,PACKER, L. & RIHN, B. H. 1998. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med*, 24, 1023-39.
- CABARAVDIC, M. 2006. [Xenoestrogen effects of chemical compounds: influence on the breast cancer]. *Med Arh*, 60, 97-100.
- CADENAS, E. 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-7.
- CADENAS, E. & DAVIES, K. J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29, 222-30.
- CALDER, P. C.,YAQOUB, P.,THIES, F.,WALLACE, F. A. & MILES, E. A. 2002. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr*, 87 Suppl 1, S31-48.
- CANTLEY, L. C.,AUGER, K. R.,CARPENTER, C.,DUCKWORTH, B.,GRAZIANI, A.,KAPELLER, R. & SOLTOFF, S. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64, 281-302.
- CARRETERO, J.,OBRADOR, E.,ANASAGASTI, M. J.,MARTIN, J. J.,VIDAL-VANACLOCHA, F. & ESTRELA, J. M. 1999. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 17, 567-74.
- CARROLL, K. K. 1992. Dietary fat and breast cancer. *Lipids*, 27, 793-7.
- CARROLL, K. K. & KHOR, H. T. 1975. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharmacol*, 10, 308-53.
- CASTELL, J. V.,DONATO, M. T. & GOMEZ-LECHON, M. J. 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol*, 57 Suppl 1, 189-204.
- CATT, K. J. D., M.L. 1993. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acciones. *Endocrinología de la reproducción*. Editorial Médica Panamericana, 126-77.

- CAVAGLIERI, C. R., NISHIYAMA, A., FERNANDES, L. C., CURI, R., MILES, E. A. & CALDER, P. C. 2003. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci*, 73, 1683-90.
- CAVALIERI, E., FRENKEL, K., LIEHR, J. G., ROGAN, E. & ROY, D. 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 75-93.
- CAVALIERI, E. L. & ROGAN, E. G. 1995. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 25, 677-88.
- CAVE, W. T. 1997. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 46, 239-246.
- CAVE, W. T. & JURKOWSKI, J. J. 1984. Dietary-Lipid Effects on the Growth, Membrane-Composition, and Prolactin-Binding Capacity of Rat Mammary-Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 73, 185-191.
- CELLI, P. & GABAI, G. 2015. Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation. *Front Vet Sci*, 2, 48.
- CLANDININ, M. T., CHEEMA, S., FIELD, C. J., GARG, M. L., VENKATRAMAN, J. & CLANDININ, T. R. 1991. Dietary-Fat - Exogenous Determination of Membrane-Structure and Cell-Function. *Faseb Journal*, 5, 2761-2769.
- CLARK, L. C., COMBS, G. F., JR., TURNBULL, B. W., SLATE, E. H., CHALKER, D. K., CHOW, J., DAVIS, L. S., GLOVER, R. A., GRAHAM, G. F., GROSS, E. G., KRONGRAD, A., LESHER, J. L., JR., PARK, H. K., SANDERS, B. B., JR., SMITH, C. L. & TAYLOR, J. R. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 276, 1957-63.
- CLARKE, R. B., ANDERSON, E. & HOWELL, A. 2004. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 15, 316-23.
- CLARKE, S. D. 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr*, 83 Suppl 1, S59-66.
- CLARKE, S. D. 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr*, 131, 1129-32.
- CLARKE, S. D. & ABRAHAM, S. 1992. Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. *FASEB J*, 6, 3146-52.
- CLARKE, S. D. & JUMP, D. B. 1993. Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res*, 32, 139-49.
- CLARKE, S. D. & JUMP, D. B. 1994. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr*, 14, 83-98.
- CLEMENT, M. V., RAMALINGAM, J., LONG, L. H. & HALLIWELL, B. 2001. The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. *Antioxid Redox Signal*, 3, 157-63.
- COCATE, P. G., NATALI, A. J., ALFENAS, R. C., DE OLIVEIRA, A., DOS SANTOS, E. C. & HERMSDORFF, H. H. 2015. Carotenoid consumption is related to lower lipid oxidation and DNA damage in middle-aged men. *Br J Nutr*, 114, 257-64.
- CODONER-FRANCH, P., BATALLER ALBEROLA, A., DOMINGO CAMARASA, J. V., ESCRIBANO MOYA, M. C. & VALLS BELLES, V. 2009. Influence of dietary lipids on the erythrocyte antioxidant status of hypercholesterolaemic children. *Eur J Pediatr*, 168, 321-7.
- COHEN, L. A. 1981. Mechanisms by Which Dietary-Fat May Stimulate Mammary Carcinogenesis in Experimental-Animals. *Cancer Research*, 41, 3808-3809.
- COHEN, L. A., THOMPSON, D. O., CHOI, K., KARMALI, R. A. & ROSE, D. P. 1986a. 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*, 77, 43-51.
- COHEN, L. A., THOMPSON, D. O., MAEURA, Y., CHOI, K., BLANK, M. E. & ROSE, D. P. 1986b. Dietary fat and mammary cancer. I. Promoting effects of different dietary fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst*, 77, 33-42.
- COMBS, G. F., JR. 2004. Status of selenium in prostate cancer prevention. *Br J Cancer*, 91, 195-9.
- CONNEY, A. H. 2003. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. *Cancer Res*, 63, 7005-31.
- COOKE, M. S., EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M. & LUNEC, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17, 1195-214.
- COSTA, I., MORAL, R., SOLANAS, M. & ESCRICH, E. 2004. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat*, 86, 225-35.
- COSTA, I., SOLANAS, M. & ESCRICH, E. 2002. 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*, 126, 915-27.
- COX, L. A., CHEN, G. & LEE, E. Y. 1994. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 32, 19-38.
- CROSS, J. V. & TEMPLETON, D. J. 2006. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1819-27.
- CURTIS, J. M., HAHN, W. S., LONG, E. K., BURRILL, J. S., ARRIAGA, E. A. & BERNLOHR, D. A. 2012. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab*, 23, 399-406.
- CHAKRAVARTI, D., PELLING, J. C., CAVALIERI, E. L. & ROGAN, E. G. 1995. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10422-6.
- CHALASANI, N., DEEG, M. A. & CRABB, D. W. 2004. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 99, 1497-502.
- CHANDRAN, M., PHILLIPS, S. A., CIARALDI, T. & HENRY, R. R. 2003. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, 26, 2442-50.
- CHAPKIN, R. S., MCMURRAY, D. N., DAVIDSON, L. A., PATIL, B. S., FAN, Y. Y. & LUPTON, J. R. 2008. Bioactive dietary long-chain fatty acids: emerging mechanisms of action. *Br J Nutr*, 100, 1152-7.
- CHEN, L. C., BOISSONNEAULT, G., HAYEK, M. G. & CHOW, C. K. 1993. Dietary fat effects on hepatic lipid peroxidation and enzymes of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism and NADPH generation. *Lipids*, 28, 657-62.
- CHEN, Q., ESPEY, M. G., SUN, A. Y., POOPUT, C., KIRK, K. L., KRISHNA, M. C., KHOSH, D. B., DRISKO, J. & LEVINE, M. 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11105-9.
- CHEUNG, C. C., THORNTON, J. E., NURANI, S. D., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2001. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology*, 74, 12-21.
- CHIARUGI, P. & FIASCHI, T. 2007. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, 19, 672-82.

- CHIOU, C.-C., CHANG, P.-Y., CHAN, E.-C., WU, T.-L., TSAO, K.-C. & WU, J. T. 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica Chimica Acta*, 334, 87-94.
- CHOE, M., KRIS, E. S., LUTHRA, R., COPENHAVER, J., PELLING, J. C., DONNELLY, T. E. & BIRT, D. F. 1992. Protein kinase C is activated and diacylglycerol is elevated in epidermal cells from Sencar mice fed high fat diets. *J Nutr*, 122, 2322-9.
- CHOI, S. Y., YU, J. H. & KIM, H. 2009. Mechanism of alpha-lipoic acid-induced apoptosis of lung cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1171, 149-55.
- CHRISTIAN, C. A. & MOENTER, S. M. 2010. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*, 31, 544-77.
- DA SILVA FARIA, T., DA FONTE RAMOS, C. & SAMPAIO, F. J. 2004. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem*, 15, 123-7.
- DAHLGREN, C. & KARLSSON, A. 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*, 232, 3-14.
- DANIEL, L. W., SCIORRA, V. A. & GHOSH, S. 1999. Phospholipase D, tumor promoters, proliferation and prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, 1439, 265-76.
- DAS, S. K. & HOEFLER, G. 2013. The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. *Trends Mol Med*, 19, 292-301.
- DAVID W. BALL, J. W. H., AND RHONDA J. SCOTT 2011. *The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry*. Flat World Education.
- DAVIDSON, L. A., LUPTON, J. R., JIANG, Y. H. & CHAPKIN, R. S. 1999. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis*, 20, 785-91.
- DAVIDSON, L. A., WANG, N., SHAH, M. S., LUPTON, J. R., IVANOV, I. & CHAPKIN, R. S. 2009. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. *Carcinogenesis*, 30, 2077-84.
- DAVIES, M. J. 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 1703, 93-109.
- DAVIES, M. J., FU, S., WANG, H. & DEAN, R. T. 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*, 27, 1151-63.
- DAVIS, C. D. & SNYDERWINE, E. G. 1995. Analysis of EGFR, TGF-alpha, neu and c-myc in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary tumors using RT-PCR. *Carcinogenesis*, 16, 3087-92.
- DE VRIES, C. E. & VAN NOORDEN, C. J. 1992. Effects of dietary fatty acid composition on tumor growth and metastasis. *Anticancer Res*, 12, 1513-22.
- DE WAARD, F. & THIJSSSEN, J. H. 2005. 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*, 97, 451-8.
- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G. & THOMPSON, C. B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7, 11-20.
- DELOUIS, C., DIJIANE, J., HOUDEBINE, L. M. & TERQUI, M. 1980. Relation between hormones and mammary gland function. *J Dairy Sci*, 63, 1492-513.
- DENARDO, D., ANDREU, P. & COUSSENS, L. M. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 309-316.

- DESLYPERE, J. P., VERDONCK, L. & VERMEULEN, A. 1985. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 61, 564-70.
- DESMARAIS, Y., MENARD, L., LAGUEUX, J. & POIRIER, G. G. 1991. Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1078, 179-86.
- DICKSON, R. B., THOMPSON, E. W. & LIPPMAN, M. E. 1990. Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37, 305-16.
- DIGIOVANNI, J., VIAJE, A., FISCHER, S., SLAGA, T. J. & BOUTWELL, R. K. 1980. Biotransformation of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene by mouse epidermal cells in culture. *Carcinogenesis*, 1, 41-9.
- DIMRI, M., BOMMI, P. V., SAHASRABUDDHE, A. A., KHANDEKAR, J. D. & DIMRI, G. P. 2010. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 31, 489-95.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T., HOLTZCLAW, W. D., COLE, R. N., ITOH, K., WAKABAYASHI, N., KATO, Y., YAMAMOTO, M. & TALALAY, P. 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11908-13.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T. & TALALAY, P. 2010. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys*, 501, 116-23.
- DIPPLE, A. 1994. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci Publ*, 107-29.
- DIPPLE, A. M., C.J.; WEISNURGER, E.K.; 1987. Metabolism of chemical carcinogens. Mechanism of cellular transformation by carcinogenic agents. Pergamon Press, 1-32.
- DIVECHA, N. & IRVINE, R. F. 1995. Phospholipid signaling. *Cell*, 80, 269-78.
- DIVISI, D., DI TOMMASO, S., SALVEMINI, S., GARRAMONE, M. & CRISCI, R. 2006. Diet and cancer. *Acta Biomed*, 77, 118-23.
- DIZDAROGLU, M., JARUGA, P., BIRINCI OGLU, M. & RODRIGUEZ, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 32, 1102-15.
- DOMENECH, J. M. 1977. *Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores*. Herder, Barcelona.
- DOMITROVIC, R., TOTA, M. & MILIN, C. 2006. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res*, 113, 177-91.
- DONATO, M. T. 2003. Citocromo P450. ¿Qué es el citocromo P450 y cómo funciona? *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XVI*, 29-62.
- DOWHAN, W., MILEYKOVSKAYA, E. & BOGDANOV, M. 2004. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 19-39.
- DREHER, D. & JUNOD, A. F. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*, 32A, 30-8.
- EDER, E., WACKER, M., LUTZ, U., NAIR, J., FANG, X., BARTSCH, H., BELAND, F. A., SCHLATTER, J. & LUTZ, W. K. 2006. Oxidative stress related DNA adducts in the liver of female rats fed with sunflower-, rapeseed-, olive- or coconut oil supplemented diets. *Chem Biol Interact*, 159, 81-9.
- ER, T. K., HOU, M. F., TSAI, E. M., LEE, J. N. & TSAI, L. Y. 2004. Differential expression of manganese containing superoxide dismutase in patients with breast cancer in Taiwan. *Ann Clin Lab Sci*, 34, 159-64.
- ERHOLA, M., TOYOKUNI, S., OKADA, K., TANAKA, T., HIAI, H., OCHI, H., UCHIDA, K., OSAWA, T., NIEMINEN, M. M., ALHO, H. & KELLOKUMPU-LEHTINEN, P. 1997. Biomarker

- evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett*, 409, 287-91.
- ESCRICH, E. 1985. Efecto de un derivado androgénico sobre la inducción y el crecimiento de tumores mamarios experimentales. Universidad Autónoma de Barcelona.
- ESCRICH, E. 1987a. Mammary cancer model induced by dimethylbenz(a)anthracene: a good experimental tool for the study of tumour markers. *Int J Biol Markers*, 2, 109-19.
- ESCRICH, E. 1987b. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. *Int J Biol Markers*, 2, 197-206.
- ESCRICH, E. 1990. lípidos de la dieta y cáncer de mama. Tesis doctoral. Barcelona.
- ESCRICH, E.,MORAL, R.,GARCIA, G.,COSTA, I.,SANCHEZ, J. A. & SOLANAS, M. 2004. Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol Carcinog*, 40, 73-8.
- ESCRICH, E.,SOLANAS, M.,MORAL, R. & ESCRICH, R. 2011. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Curr Pharm Des*, 17, 813-30.
- ESCRICH, E.,SOLANAS, M.,RUIZ DE VILLA, M. C.,RIBALTA, T.,MUNTANE, J. & SEGURA, R. 1994a. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: II--Suitability of the diets. *In Vivo*, 8, 1107-11.
- ESCRICH, E.,SOLANAS, M. & SEGURA, R. 1994b. Experimental diets for the study of lipid influence on the induced mammary carcinoma in rats: I--Diet definition. *In Vivo*, 8, 1099-105.
- ESCRICH, E.,SOLANAS, M.,SOLER, M.,RUIZ DE VILLA, M. C.,SANCHEZ, J. A. & SEGURA, R. 2001. Dietary polyunsaturated n-6 lipids effects on the growth and fatty acid composition of rat mammary tumors. *J Nutr Biochem*, 12, 536-549.
- ESCRICH, E. S., M.; MORAL, R. 2006. Olive oil and other dietary lipids, in 575 cancer: experimental approaches. *Olive oil and health*, 317-74.
- ESCRICH, R. V., E.; COSTA, I.; RUIZ DE VILLA, M.C.; SOLANAS, M.; ESCRICH, E.; MORAL R. 2016. High-fat diets influence clinical and histopathological characteristics of DMBA-induced mammary cancer and modify tumor gene expression profile. *BMC Cancer* (Submitted for publication).
- ESTELLER, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358, 1148-59.
- ESTRELA, J. M.,ORTEGA, A. & OBRADOR, E. 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 43, 143-81.
- ESTRUCH, R. 2010. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc Nutr Soc*, 69, 333-40.
- ESWORTHY, R. S.,SWIDEREK, K. M.,HO, Y. S. & CHU, F. F. 1998. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim Biophys Acta*, 1381, 213-26.
- EVAN, G. I. & VOUSDEN, K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-8.
- EVANS, R. M.,BARISH, G. D. & WANG, Y. X. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, 10, 355-61.
- EXTON, J. H. 1994. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu Rev Physiol*, 56, 349-69.
- FABIANI, R.,DE BARTOLOMEO, A.,ROSIGNOLI, P.,SERVILI, M.,SELVAGGINI, R.,MONTEDORO, G. F.,DI SAVERIO, C. & MOROZZI, G. 2006. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr*, 136, 614-9.

- FANG, J. L., VACA, C. E., VALSTA, L. M. & MUTANEN, M. 1996. Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition. *Carcinogenesis*, 17, 1035-40.
- FAY, M. P., FREEDMAN, L. S., CLIFFORD, C. K. & MIDTHUNE, D. N. 1997. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res*, 57, 3979-88.
- FERLAY, J. S. I. D., R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*.
- FERNANDES, G., CHANDRASEKAR, B., LUAN, X. & TROYER, D. A. 1996. Modulation of antioxidant enzymes and programmed cell death by n-3 fatty acids. *Lipids*, 31 Suppl, S91-6.
- FERNANDES, G. & VENKATRAMAN, J. T. 1991. Modulation of breast cancer growth in nude mice by omega 3 lipids. *World Rev Nutr Diet*, 66, 488-503.
- FERNANDEZ-QUINTELA, A., CHURRUCA, I. & PORTILLO, M. P. 2007. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr*, 10, 1126-31.
- FERRONE, C. & DRANOFF, G. 2010. Dual Roles for Immunity in Gastrointestinal Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 4045-4051.
- FIGEL, H., MILLINGER, S., MUELLER-HOLZNER, E., MARTH, C., ENSINGER, C., BERGER, A., KLOCKER, H., GOEBEL, G. & WIDSCHWENDTER, M. 2005. Circulating tumor-specific DNA: A marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Research*, 65, 1141-1145.
- FOKSINSKI, M., KOTZBACH, R., SZYMANSKI, W. & OLINSKI, R. 2000. The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med*, 29, 597-601.
- FREED-PASTOR, W. A. & PRIVES, C. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development*, 26, 1268-1286.
- FREEDMAN, L. S., CLIFFORD, C. & MESSINA, M. 1990. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. *Cancer Res*, 50, 5710-9.
- FREEMAN, M. R. & SOLOMON, K. R. 2004. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem*, 91, 54-69.
- FRISCH, R. E., HEGSTED, D. M. & YOSHINAGA, K. 1975. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 4172-6.
- FU, J., ASTARITA, G., GAETANI, S., KIM, J., CRAVATT, B. F., MACKIE, K. & PIOMELLI, D. 2007. Food intake regulates oleoylethanolamide formation and degradation in the proximal small intestine. *J Biol Chem*, 282, 1518-28.
- FU, J., OVEISI, F., GAETANI, S., LIN, E. & PIOMELLI, D. 2005. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, 48, 1147-53.
- FU, T. Y., HOU, Y. Y., CHU, S. T., LIU, C. F., HUANG, C. H., CHEN, H. C., HSIAO, M., LU, P. J., WANG, J. S. & GER, L. P. 2011. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase as prognostic markers in patients with buccal mucosal squamous cell carcinomas. *Head Neck*, 33, 1606-15.
- GALLARDO, J. M., MEDINA, I., MÉNDEZ, L., NOGUÉS, M. R., PAZOS, M., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ROMEU, M. & TORRES, J. L. 2013. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine  $\omega$ 3 PUFAs. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 8-20.
- GALLUS, S., BOSETTI, C. & LA VECCHIA, C. 2004. Mediterranean diet and cancer risk. *Eur J Cancer Prev*, 13, 447-52.

- GAO, L., WANG, J., SEKHAR, K. R., YIN, H., YARED, N. F., SCHNEIDER, S. N., SASI, S., DALTON, T. P., ANDERSON, M. E., CHAN, J. Y., MORROW, J. D. & FREEMAN, M. L. 2007. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem*, 282, 2529-37.
- GAYTHER, S. A., WARREN, W., MAZOYER, S., RUSSELL, P. A., HARRINGTON, P. A., CHIANO, M., SEAL, S., HAMOUDI, R., VAN RENSBURG, E. J., DUNNING, A. M., LOVE, R., EVANS, G., EASTON, D., CLAYTON, D., STRATTON, M. R. & PONDER, B. A. 1995. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet*, 11, 428-33.
- GERELTSETSEG, G., MATSUZAKI, T., IWASA, T., KINOUCI, R., NAKAZAWA, H., YAMAMOTO, S., KUWAHARA, A., YASUI, T. & IRAHARA, M. 2012. Delay in the onset of puberty of intrauterine growth retarded female rats cannot be rescued with hypernutrition after birth. *Endocr J*, 59, 963-72.
- GERSCHMAN, R., GILBERT, D. L., NYE, S. W., DWYER, P. & FENN, W. O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119, 623-6.
- GIDWITZ, S., PESSIN, J. E., WEBER, M. J., GLASER, M. & STORM, D. R. 1980. Effect of membrane phospholipid composition changes on adenylate cyclase activity in normal and rous-sarcoma-transformed chicken embryo fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 628, 263-76.
- GIULIVI, C. & CADENAS, E. 1998. The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1366, 265-74.
- GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., LORENZINI, S., MILZANI, A. & ROSSI, R. 2006. Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61, 1030-8.
- GLASGOW, W. C., HUI, R., EVERHART, A. L., JAYAWICKREME, S. P., ANGERMAN-STEWART, J., HAN, B. B. & ELING, T. E. 1997. The linoleic acid metabolite, (13S)-hydroperoxyoctadecadienoic acid, augments the epidermal growth factor receptor signaling pathway by attenuation of receptor dephosphorylation. Differential response in Syrian hamster embryo tumor suppressor phenotypes. *J Biol Chem*, 272, 19269-76.
- GLORIEUX, C., DEJEANS, N., SID, B., BECK, R., CALDERON, P. B. & VERRAX, J. 2011. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*, 82, 1384-90.
- GO, Y. M. & JONES, D. P. 2005. Intracellular proatherogenic events and cell adhesion modulated by extracellular thiol/disulfide redox state. *Circulation*, 111, 2973-80.
- GONZALEZ-YANES, C., SERRANO, A., BERMUDEZ-SILVA, F. J., HERNANDEZ-DOMINGUEZ, M., PAEZ-CHOA, M. A., RODRIGUEZ DE FONSECA, F. & SANCHEZ-MARGALET, V. 2005. Oleylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E923-9.
- GRABER, R., SUMIDA, C. & NUNEZ, E. A. 1994. Fatty acids and cell signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 9, 91-116.
- GRAHAM, J. D. & CLARKE, C. L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18, 502-19.
- GRAY, J., EVANS, N., TAYLOR, B., RIZZO, J. & WALKER, M. 2009. State of the evidence: the connection between breast cancer and the environment. *Int J Occup Environ Health*, 15, 43-78.
- GREEN, D. R. & EVAN, G. I. 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell*, 1, 19-30.

- GRIMARD, R., TANCREDE, P. & GICQUAUD, C. 1993. Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study. *Biochem Biophys Res Commun*, 190, 1017-22.
- GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R. & KARIN, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140, 883-899.
- GROSSMANN, M. E., RAY, A., DOGAN, S., MIZUNO, N. K. & CLEARY, M. P. 2008. Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth. *Cell Res*, 18, 1154-6.
- GUO, W. & GIANCOTTI, F. G. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 816-26.
- HAEFFNER, E. W. 1993. Diacylglycerol: formation and function in phospholipid-mediated signal transduction. *Comp Biochem Physiol C*, 105, 337-45.
- HAGGAG MEL, S., ELSANHOTY, R. M. & RAMADAN, M. F. 2014. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4, 52-8.
- HALASZ, B., KOVES, K., MOLNAR, J., BALIKA, K., STOLL, V. & KOVACS, G. 1988. Hypothalamus and puberty. *Brain Res Bull*, 20, 709-12.
- HALL, M. G., P.L. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumor initiation. *Chem Carcinogenesis and Mutagenesis*, 94, 327-372.
- HALLIWELL, B. 2000. The antioxidant paradox. *Lancet*, 355, 1179-80.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312-22.
- HALLIWELL, B. 2008a. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 107-112.
- HALLIWELL, B. 2008b. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*, 476, 107-12.
- HALLIWELL, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 70, 257-65.
- HALLIWELL, B. 2013. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol*, 75, 637-44.
- HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J. M. C. 1993. Free radicals in biology and medicine. First Edition. Oxford University Press.
- HALLIWELL, B., RAFTER, J. & JENNER, A. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr*, 81, 268S-276S.
- HALLIWELL, B. G., J.M.C. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth edition.
- HAMID, R., SINGH, J., REDDY, B. S. & COHEN, L. A. 1999. Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int J Oncol*, 14, 523-8.
- HAMMAMIEH, R., CHAKRABORTY, N., MILLER, S. A., WADDY, E., BARMADA, M., DAS, R., PEEL, S. A., DAY, A. A. & JETT, M. 2007. Differential effects of omega-3 and omega-6 Fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 101, 7-16.
- HAMMER, A., FERRO, M., TILLIAN, H. M., TATZBER, F., ZOLLNER, H., SCHAUENSTEIN, E. & SCHAUR, R. J. 1997. Effect of oxidative stress by iron on 4-hydroxynonenal formation and proliferative activity in hepatomas of different degrees of differentiation. *Free Radic Biol Med*, 23, 26-33.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.

- HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- HARRIS, C. C. 1996. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 3, 435-9.
- HARTWELL, L. 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71, 543-6.
- HARVEY, C. J., THIMMULAPPA, R. K., SINGH, A., BLAKE, D. J., LING, G., WAKABAYASHI, N., FUJII, J., MYERS, A. & BISWAL, S. 2009. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 46, 443-53.
- HARVEY, P. W. & DARBRE, P. 2004. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? *J Appl Toxicol*, 24, 167-76.
- HASHIM, Y. Z., ENG, M., GILL, C. I., MCGLYNN, H. & ROWLAND, I. R. 2005. Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr Rev*, 63, 374-86.
- HASHIMOTO, K., TAKASAKI, W., SATO, I. & TSUDA, S. 2007. DNA damage measured by comet assay and 8-OH-dG formation related to blood chemical analyses in aged rats. *J Toxicol Sci*, 32, 249-59.
- HILAKIVI-CLARKE, L. 2007. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr Cancer Drug Targets*, 7, 465-74.
- HILAKIVI-CLARKE, L., STOICA, A., RAYGADA, M. & MARTIN, M. B. 1998. 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*, 58, 654-60.
- HILL, M. J., GODDARD, P. & WILLIAMS, R. E. 1971. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet*, 2, 472-3.
- HILLYARD, L. A. & ABRAHAM, S. 1979. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinomas in mice and rats. *Cancer Res*, 39, 4430-7.
- HIMENO, Y., ENGELMAN, R. W. & GOOD, R. A. 1992. Influence of calorie restriction on oncogene expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5497-501.
- HO, Y. S., MAGNENAT, J. L., BRONSON, R. T., CAO, J., GARGANO, M., SUGAWARA, M. & FUNK, C. D. 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem*, 272, 16644-51.
- HOLDER, J. W., ELMORE, E. & BARRETT, J. C. 1993. Gap junction function and cancer. *Cancer Res*, 53, 3475-85.
- HOLLANDER, M. C., KOVALSKY, O., SALVADOR, J. M., KIM, K. E., PATTERSON, A. D., HAINES, D. C. & FORNACE, A. J., JR. 2001. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer Res*, 61, 2487-91.
- HONDA, T., COPPOLA, S., GHIBELLI, L., CHO, S. H., KAGAWA, S., SPURGERS, K. B., BRISBAY, S. M., ROTH, J. A., MEYN, R. E., FANG, B. & MCDONNELL, T. J. 2004. GSH depletion enhances adenoviral bax-induced apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 11, 249-55.
- HONG, F., SEKHAR, K. R., FREEMAN, M. L. & LIEBLER, D. C. 2005. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem*, 280, 31768-75.
- HOUBEINE, L. M. 1986. [Hormonal control of the development and activity of the mammary gland]. *Reprod Nutr Dev*, 26, 523-41.

## *Bibliografía*

- HOWELL, A. D. F., D.; ANDERSON, E. 1993. Mecanismos de respuesta y resistencia a la terapia endocrina en el cáncer de mama y desarrollo de nuevos tratamientos. *Journal of Endocrinology*, 43, 7-26.
- HSIEH, C. C., TRICHOPOULOS, D., KATSOUYANNI, K. & YUASA, S. 1990. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*, 46, 796-800.
- HSU, P. P. & SABATINI, D. M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134, 703-7.
- HU, M. L., FRANKEL, E. N., LEIBOVITZ, B. E. & TAPPEL, A. L. 1989. Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates. *J Nutr*, 119, 1574-82.
- HU, X., JUNEJA, S. C., MAIHLE, N. J. & CLEARY, M. P. 2002. Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1704-11.
- HU, Y., ROSEN, D. G., ZHOU, Y., FENG, L., YANG, G., LIU, J. & HUANG, P. 2005. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem*, 280, 39485-92.
- HUGGINS, C., GRAND, L. C. & BRILLANTES, F. P. 1961a. Mammary cancer induced by a single feeding of polymuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature*, 189, 204-7.
- HUGGINS, C., MORII, S. & GRAND, L. C. 1961b. Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. *Ann Surg*, 154(6)Suppl, 315-8.
- HUGHES-FULFORD, M., CHEN, Y. & TJANDRAWINATA, R. R. 2001. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 22, 701-7.
- HULBERT, A. J. & ELSE, P. L. 2000. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu Rev Physiol*, 62, 207-35.
- HULBERT, A. J., TURNER, N., STORLIEN, L. H. & ELSE, P. L. 2005. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biological Reviews*, 80, 155-169.
- HUNTER, T. 1991. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64, 249-70.
- HWANG, D. 2000. Fatty acids and immune responses--a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr*, 20, 431-56.
- IBRAHIM, N. K. & HORTOBAGYI, G. N. 1998. New antiestrogens in breast cancer: a review. *Breast J*, 4, 213-29.
- IKEGAMI, K., LALONDE, C., YOUNG, Y. K., PICARD, L. & DEMLING, R. 1994. Comparison of plasma reduced glutathione and oxidized glutathione with lung and liver tissue oxidant and antioxidant activity during acute inflammation. *Shock*, 1, 307-12.
- IMAGAWA W, Y. J., GUZMÁN R, NANDI S. 1994. Control of mammary gland development. *The physiology of reproduction*, 1033-63.
- INNAMI, S., YANG, M. G., MICKELSEN, O. & HAFS, H. D. 1973. The influence of high-fat diets on estrous cycles, sperm production and fertility of rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 143, 63-8.
- IP, C. 1987. Fat and essential fatty acid in mammary carcinogenesis. *Am J Clin Nutr*, 45, 218-24.
- IP, C. 1997. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr*, 66, 1523S-1529S.
- IP, C., BRIGGS, S. P., HAEGELE, A. D., THOMPSON, H. J., STORKSON, J. & SCIMECA, J. A. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, 17, 1045-50.

- IP, C. & IP, M. M. 1981. Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J Natl Cancer Inst*, 66, 291-5.
- IP, C., IP, M. M. & SYLVESTER, P. 1986. Relevance of trans fatty acids and fish oil in animal tumorigenesis studies. *Prog Clin Biol Res*, 222, 283-94.
- IP, C., YIP, P. & BERNARDIS, L. L. 1980. Role of prolactin in the promotion of dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors by dietary fat. *Cancer Res*, 40, 374-8.
- IP, M. M., MASSO-WELCH, P. A. & IP, C. 2003. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of the stroma and the epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8, 103-18.
- IRIGARAY, P. & BELPOMME, D. 2010. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 31, 135-48.
- IRIGARAY, P., NEWBY, J. A., LACOMME, S. & BELPOMME, D. 2007. Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. *Biomed Pharmacother*, 61, 665-78.
- ISHIKAWA, M., KITAYAMA, J. & NAGAWA, H. 2004. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 4325-31.
- IWASE, H., OMOTO, Y., IWATA, H., HARA, Y., ANDO, Y. & KOBAYASHI, S. 1998. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology*, 55 Suppl 1, 11-6.
- IZZOTTI, A., CAMOIRANO, A., CARTIGLIA, C., GRUBBS, C. J., LUBET, R. A., KELLOFF, G. J. & DE FLORA, S. 1999. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Cancer Res*, 59, 4285-90.
- JANDACEK, R. J. & TSO, P. 2001. Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. *Lipids*, 36, 1289-305.
- JANUEL, C., FAY, L. B., RUGGIERO, D., LAGARDE, M. & VERICEL, E. 2003. Covalent coupling of reduced glutathione with ribose: loss of cosubstrate ability to glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1620, 125-32.
- JARAMILLO, M. C. & ZHANG, D. D. 2013. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev*, 27, 2179-91.
- JARDE, T., CALDEFIE-CHEZET, F., DAMEZ, M., MISHPELLANY, F., PENAULT-LLORCA, F., GUILLOT, J. & VASSON, M. P. 2008. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncol Rep*, 19, 905-11.
- JARDE, T., PERRIER, S., VASSON, M. P. & CALDEFIE-CHEZET, F. 2011. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur J Cancer*, 47, 33-43.
- JEFFERIES, H., COSTER, J., KHALIL, A., BOT, J., MCCAULEY, R. D. & HALL, J. C. 2003. Glutathione. *ANZ J Surg*, 73, 517-22.
- JEONG, Y. J., BONG, J. G., PARK, S. H., CHOI, J. H. & OH, H. K. 2011. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Breast Cancer*, 14, 96-103.
- JI, L. L., DILLON, D. & WU, E. 1990. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*, 258, R918-23.
- JIANG, W. G., HISCOX, S., HALLETT, M. B., HORROBIN, D. F., MANSEL, R. E. & PUNTIS, M. C. 1995. Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res*, 55, 5043-8.
- JIANG, W. G., HISCOX, S., HORROBIN, D. F., BRYCE, R. P. & MANSEL, R. E. 1997. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 639-44.

## Bibliografía

- JIN, D. P., LI, C. Y., YANG, H. J., ZHANG, W. X., LI, C. L., GUAN, W. J. & MA, Y. H. 2011. Apoptotic effects of hydrogen peroxide and vitamin C on chicken embryonic fibroblasts: redox state and programmed cell death. *Cytotechnology*, 63, 461-71.
- JOHNSON, A. T., KAUFMANN, Y., LUO, S., BABB, K., HAWK, R. & KLIMBERG, V. S. 2003. Gut glutathione metabolism and changes with 7,12-DMBA and glutamine. *Journal of Surgical Research*, 115, 242-246.
- JONES, D. P. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*, 348, 93-112.
- JONES, D. P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1865-79.
- JONES, R. G. & THOMPSON, C. B. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*, 23, 537-48.
- JOVANOVIĆ, J., RONNEBERG, J. A., TOST, J. & KRISTENSEN, V. 2010. The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol*, 4, 242-54.
- JUMP, D. B. 2004. Fatty acid regulation of gene transcription. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41, 41-78.
- JUMP, D. B., CLARKE, S. D., MACDOUGALD, O. & THELEN, A. 1993. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8454-8.
- JUNG, K. & HENKE, W. 1996. Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radic Biol Med*, 20, 613-7.
- KACHHAP, S. K., DANGE, P. & NATH GHOSH, S. 2000. Effect of omega-6 polyunsaturated fatty acid (linoleic acid) on BRCA1 gene expression in MCF-7 cell line. *Cancer Lett*, 154, 115-20.
- KANG, S. A., JANG, Y. J. & PARK, H. 1998. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res*, 28, 93-107.
- KANNER, J., GORELIK, S., ROMAN, S. & KOHEN, R. 2012. Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low-density lipoprotein modification: the stomach as a bioreactor. *J Agric Food Chem*, 60, 8790-6.
- KAPUT, J. & RODRIGUEZ, R. L. 2004. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics*, 16, 166-77.
- KARMALI, R. A., DONNER, A., GOBEL, S. & SHIMAMURA, T. 1989. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on 7,12 dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Anticancer Res*, 9, 1161-7.
- KARNOUB, A. E. & WEINBERG, R. A. 2006. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis*, 26, 75-85.
- KEEN, J. C. & DAVIDSON, N. E. 2003. The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 97, 825-33.
- KELCH, R. P., HOPWOOD, N. J., SAUDER, S. & MARSHALL, J. C. 1985. Evidence for decreased secretion of gonadotropin-releasing hormone in pubertal boys during short-term testosterone treatment. *Pediatr Res*, 19, 112-7.
- KELLER-WOOD, M. B., K.I. 1991. Breast physiology in normal, lactating and diseased states. *Breast Comprehensive Managements of Bening and Malignant Diseases.*, 36-40.
- KELLER, J. N., KINDY, M. S., HOLTSBERG, F. W., ST CLAIR, D. K., YEN, H. C., GERMEYER, A., STEINER, S. M., BRUCE-KELLER, A. J., HUTCHINS, J. B. & MATTSON, M. P. 1998. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*, 18, 687-97.
- KENNY, F. S., GEE, J. M., NICHOLSON, R. I., ELLIS, I. O., MORRIS, T. M., WATSON, S. A., BRYCE, R. P. & ROBERTSON, J. F. 2001. Effect of dietary GLA+/-tamoxifen on the growth, ER

- expression and fatty acid profile of ER positive human breast cancer xenografts. *Int J Cancer*, 92, 342-7.
- KEY, T. J.,APPLEBY, P. N.,REEVES, G. K.,RODDAM, A.,DORGAN, J. F.,LONGCOPE, C.,STANCZYK, F. Z.,STEPHENSON, H. E., JR.,FALK, R. T.,MILLER, R.,SCHATZKIN, A.,ALLEN, D. S.,FENTIMAN, I. S.,KEY, T. J.,WANG, D. Y.,DOWSETT, M.,THOMAS, H. V.,HANKINSON, S. E.,TONIOLO, P.,AKHMEDKHANOV, A.,KOENIG, K.,SHORE, R. E.,ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.,BERRINO, F.,MUTI, P.,MICHELI, A.,KROGH, V.,SIERI, S.,PALA, V.,VENTURELLI, E.,SECRETO, G.,BARRETT-CONNOR, E.,LAUGHLIN, G. A.,KABUTO, M.,AKIBA, S.,STEVENS, R. G.,NERIISHI, K.,LAND, C. E.,CAULEY, J. A.,KULLER, L. H.,CUMMINGS, S. R.,HELZLSOUER, K. J.,ALBERG, A. J.,BUSH, T. L.,COMSTOCK, G. W.,GORDON, G. B.,MILLER, S. R.,LONGCOPE, C. & ENDOGENOUS HORMONES BREAST CANCER COLLABORATIVE, G. 2003. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1218-26.
- KHAN, N.,ADHAMI, V. M. & MUKHTAR, H. 2010. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 17, R39-52.
- KHAN, S. A. & VANDEN HEUVEL, J. P. 2003. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *J Nutr Biochem*, 14, 554-67.
- KIM, H.,CHOI, S.,LEE, H. J.,LEE, J. H. & CHOI, H. 2003. Suppression of fatty acid synthase by dietary polyunsaturated fatty acids is mediated by fat itself, not by peroxidative mechanism. *J Biochem Mol Biol*, 36, 258-64.
- KIM, K. H. & TAE, H. J. 1994. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J Nutr*, 124, 1273S-1283S.
- KIMATA, K.,SAKAKURA, T.,INAGUMA, Y.,KATO, M. & NISHIZUKA, Y. 1985. Participation of two different mesenchymes in the developing mouse mammary gland: synthesis of basement membrane components by fat pad precursor cells. *J Embryol Exp Morphol*, 89, 243-57.
- KING, M. M. M., P.B.; RUSSO, I.H. 1983. Dietary fat may influence DMBA-initiated mammary gland carcinogenesis by modification of mammary gland development. *Diet, nutrition and cancer: from basic research to policy implications*, 61-90.
- KINNULLA, V. L. & CRAPO, J. D. 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*, 36, 718-44.
- KINNUNEN, P. K.,KOIV, A.,LEHTONEN, J. Y.,RYTOMAA, M. & MUSTONEN, P. 1994. Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces. *Chem Phys Lipids*, 73, 181-207.
- KIRIMLIOGLU, V.,SOZEN, H.,TURKOGLU, S. & HABERAL, M. 2008. Protective effect of resveratrol, a red wine constituent polyphenol, on rats subjected to portal vein thrombosis. *Transplant Proc*, 40, 290-2.
- KNERR, I.,SCHUSTER, S.,NOMIKOS, P.,BUCHFELDER, M.,DOTSCH, J.,SCHOOF, E.,FAHLBUSCH, R. & RASCHER, W. 2001. 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*, 27, 215-22.
- KOHN, D. F. & CLIFFORD, C. B. 2002. Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats A2 - Fox, James G. In: ANDERSON, L. C., LOEW, F. M. & QUIMBY, F. W. (eds.) *Laboratory Animal Medicine (Second Edition)*. Burlington: Academic Press.
- KOJO, S. 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11, 1041-64.
- KOSSOY, G.,MADAR, Z.,BEN-HUR, H.,GAL, R.,STARK, A.,COHEN, O. & ZUSMAN, I. 2001. Transplacental effect of a 15% olive-oil diet on functional activity of immune components in the spleen and colon tumors of rat offspring. *Oncol Rep*, 8, 1045-9.

- KOVACIC, P. & JACINTHO, J. D. 2001. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem*, 8, 773-96.
- KRATZ, M., VON ECKARDSTEIN, A., FOBKER, M., BUYKEN, A., POSNY, N., SCHULTE, H., ASSMANN, G. & WAHRBURG, U. 2002. The impact of dietary fat composition on serum leptin concentrations in healthy nonobese men and women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 5008-5014.
- KRIS-ETHERTON, P. M., PEARSON, T. A., WAN, Y., HARGROVE, R. L., MORIARTY, K., FISHELL, V. & ETHERTON, T. 1999. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 1009-1015.
- KRITCHEVSKY, D. 1999. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Toxicol Sci*, 52, 13-6.
- KRITCHEVSKY, D., WEBER, M. M. & KLURFELD, D. M. 1984. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res*, 44, 3174-7.
- KUHN, H. & BORCHERT, A. 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med*, 33, 154-72.
- KUMARAGURUPARAN, R., SESHAGIRI, P. B., HARA, Y. & NAGINI, S. 2007. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by black tea polyphenols: modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes, oxidative stress, cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Mol Carcinog*, 46, 797-806.
- KWAK, M. K. & KENSLER, T. W. 2010. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244, 66-76.
- LA MERRILL, M., EMOND, C., KIM, M. J., ANTIGNAC, J. P., LE BIZEC, B., CLEMENT, K., BIRNBAUM, L. S. & BAROUKI, R. 2013. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect*, 121, 162-9.
- LA MERRILL, M., KURUVILLA, B. S., POMP, D., BIRNBAUM, L. S. & THREADGILL, D. W. 2009. Dietary fat alters body composition, mammary development, and cytochrome p450 induction after maternal TCDD exposure in DBA/2J mice with low-responsive aryl hydrocarbon receptors. *Environ Health Perspect*, 117, 1414-9.
- LA VECCHIA, C., NEGRI, E., FRANCESCHI, S., DECARLI, A., GIACOSA, A. & LIPWORTH, L. 1995. Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy). *Cancer Causes Control*, 6, 545-50.
- LAHMANN, P. H., HOFFMANN, K., ALLEN, N., VAN GILS, C. H., KHAW, K. T., TEHARD, B., BERRINO, F., TJONNELAND, A., BIGAARD, J., OLSEN, A., OVERVAD, K., CLAVEL-CHAPELON, F., NAGEL, G., BOEING, H., TRICHOPOULOS, D., ECONOMOU, G., BELLOS, G., PALLI, D., TUMINO, R., PANICO, S., SACERDOTE, C., KROGH, V., PEETERS, P. H., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., LUND, E., ARDANAZ, E., AMIANO, P., PERA, G., QUIROS, J. R., MARTINEZ, C., TORMO, M. J., WIRFALT, E., BERGLUND, G., HALLMANS, G., KEY, T. J., REEVES, G., BINGHAM, S., NORAT, T., BIESSY, C., KAAKS, R. & RIBOLI, E. 2004. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, 111, 762-71.
- LANDIS, G. N. & TOWER, J. 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*, 126, 365-79.
- LANDSCHULZ, K. T. K., K.H.; LANE, M.D. 1991. Regulation of mouse liver stearoyl-CoA desaturase gene expression by dietary carbohydrate and fat. *FASEB J*, 5.
- LANE, N. 2003. Oxygen: the molecule that made the world.
- LARSSON, S. C., KUMLIN, M., INGELMAN-SUNDBERG, M. & WOLK, A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 79, 935-45.

- LEE, E. Y. & MULLER, W. J. 2010. Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2, a003236.
- LEE, M. M. & LIN, S. S. 2000. Dietary fat and breast cancer. Annu Rev Nutr, 20, 221-48.
- LEHMAN, M. N., COOLEN, L. M. & GOODMAN, R. L. 2010. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology, 151, 3479-89.
- LEON-GONZALEZ, A. J., AUGER, C. & SCHINI-KERTH, V. B. 2015. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. Biochem Pharmacol, 98, 371-80.
- LEONG, P. K. K. K. 2016. Induction of the Glutathione Antioxidant Response/Glutathione Redox Cycling by Nutraceuticals: Mechanism of Protection against Oxidant-induced Cell Death. Curr Trends Nutraceuticals.
- LEUNG, H. Y., YUNG, L. H., POON, C. H., SHI, G., LU, A. L. & LEUNG, L. K. 2009a. Genistein protects against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced oxidative DNA damage in non-cancerous breast cells MCF-10A. Br J Nutr, 101, 257-62.
- LEUNG, H. Y., YUNG, L. H., SHI, G., LU, A. L. & LEUNG, L. K. 2009b. The red wine polyphenol resveratrol reduces polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage in MCF-10A cells. Br J Nutr, 102, 1462-8.
- LI, D., ZHANG, W., ZHU, J., CHANG, P., SAHIN, A., SINGLETARY, E., BONDY, M., HAZRA, T., MITRA, S., LAU, S. S., SHEN, J. & DIGIOVANNI, J. 2001. Oxidative DNA damage and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine DNA glycosylase/apurinic lyase in human breast cancer. Mol Carcinog, 31, 214-23.
- LI, Y., HUANG, T. T., CARLSON, E. J., MELOV, S., URSELL, P. C., OLSON, J. L., NOBLE, L. J., YOSHIMURA, M. P., BERGER, C., CHAN, P. H., WALLACE, D. C. & EPSTEIN, C. J. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat Genet, 11, 376-81.
- LINDSEY, J. R. & BAKER, H. J. 2006. Chapter 1 - Historical Foundations A2 - Suckow, Mark A. In: WEISBROTH, S. H. & FRANKLIN, C. L. (eds.) The Laboratory Rat (Second Edition). Burlington: Academic Press.
- LIOU, G. Y. & STORZ, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. Free Radic Res, 44, 479-96.
- LIPPMAN, M. E. D., R.B. 1991. Regulatory mechanisms in breast cancer. Advances in cellular and molecular biology of breast cancer. Cancer Treat Res, 53.
- LIU, R. M. 2002. Down-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging. J Neurosci Res, 68, 344-51.
- LO VERME, J., GAETANI, S., FU, J., OVEISI, F., BURTON, K. & PIOMELLI, D. 2005. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. Cell Mol Life Sci, 62, 708-16.
- LOMEO, F., KHOKHER, M. A. & DANDONA, P. 1986. Unsaturated Fatty-Acids Potentiate Insulin Action on Adipocytes. Progress in Lipid Research, 25, 511-513.
- LORINCZ, A. M. & SUKUMAR, S. 2006. Molecular links between obesity and breast cancer. Endocr Relat Cancer, 13, 279-92.
- LOSCALZO, J. 2008. Membrane redox state and apoptosis: death by peroxide. Cell Metab, 8, 182-3.
- LU, S. C. 2013. Glutathione synthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1830, 3143-3153.
- LU, Y. P., LOU, Y. R., YEN, P., NEWMARK, H. L., MIROCHNITCHENKO, O. I., INOUYE, M. & HUANG, M. T. 1997. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. Cancer Res, 57, 1468-74.

- LUO, J.-L.,HAMMARQVIST, F.,ANDERSSON, K. & WERNERMAN, J. 1998. Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 275, E359-E365.
- LUSHCHAK, V. I. 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*, 2012, 736837.
- LYNCH, H. T.,SNYDER, C. & LYNCH, J. 2012. Hereditary Breast Cancer: Practical Pursuit for Clinical Translation. *Annals of Surgical Oncology*, 19, 1723-1731.
- LLUIS, L.,TALTAVULL, N.,MUNOZ-CORTES, M.,SANCHEZ-MARTOS, V.,ROMEU, M.,GIRALT, M.,MOLINAR-TORIBIO, E.,TORRES, J. L.,PEREZ-JIMENEZ, J.,PAZOS, M.,MENDEZ, L.,GALLARDO, J. M.,MEDINA, I. & NOGUES, M. R. 2013. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids Health Dis*, 12, 140.
- MA, D. W.,SEO, J.,DAVIDSON, L. A.,CALLAWAY, E. S.,FAN, Y. Y.,LUPTON, J. R. & CHAPKIN, R. S. 2004a. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. *FASEB J*, 18, 1040-2.
- MA, D. W.,SEO, J.,SWITZER, K. C.,FAN, Y. Y.,MCMURRAY, D. N.,LUPTON, J. R. & CHAPKIN, R. S. 2004b. n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem*, 15, 700-6.
- MACLENNAN, M. & MA, D. W. 2010. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, 211.
- MAEDA, K.,OHKURA, S.,UENOYAMA, Y.,WAKABAYASHI, Y.,OKA, Y.,TSUKAMURA, H. & OKAMURA, H. 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*, 1364, 103-15.
- MAGEE, P. J. & ROWLAND, I. R. 2004. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr*, 91, 513-31.
- MAHER, P. 2005. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev*, 4, 288-314.
- MAIORINO, M.,THOMAS, J. P.,GIROTTI, A. W. & URSINI, F. 1991. Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic Res Commun*, 12-13 Pt 1, 131-5.
- MANGAS-CRUZ, M. A.,FERNANDEZ-MOYANO, A.,ALBI, T.,GUINDA, A.,RELIMPIO, F.,LANZON, A.,PEREIRA, J. L.,SERRERA, J. L.,MONTILLA, C.,ASTORGA, R. & GARCIA-LUNA, P. P. 2001. Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clin Nutr*, 20, 211-5.
- MANN, D. R. & PLANT, T. M. 2002. Leptin and pubertal development. *Semin Reprod Med*, 20, 93-102.
- MANNELLO, F.,TONTI, G. A. & MEDDA, V. 2009. Protein oxidation in breast microenvironment: Nipple aspirate fluid collected from breast cancer women contains increased protein carbonyl concentration. *Cell Oncol*, 31, 383-92.
- MANSARA, P. P.,DESHPANDE, R. A.,VAIDYA, M. M. & KAUL-GHANEKAR, R. 2015. Differential Ratios of Omega Fatty Acids (AA/EPA+DHA) Modulate Growth, Lipid Peroxidation and Expression of Tumor Regulatory MARBPs in Breast Cancer Cell Lines MCF7 and MDA-MB-231. *PLoS One*, 10, e0136542.
- MANTOVANI, A. 2009. Cancer-related inflammation: the seventh hallmark of cancer. *American Society of Clinical Oncology. ASCO.*, 723-26.
- MANTOVANI, A.,ALLAVENA, P.,SICA, A. & BALKWILL, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-44.
- MANTZOROS, C.,PETRIDOU, E.,DESSYPRIS, N.,CHAVELAS, C.,DALAMAGA, M.,ALEXE, D. M.,PAPADIAMANTIS, Y.,MARKOPOULOS, C.,SPANOS, E.,CHROUSOS, G. &

- TRICHOPOULOS, D. 2004. Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 1102-7.
- MANZANARES, M. A., DE MIGUEL, C.; RUÍZ DED VILLA, M. C.; SANTELLA, R. M.; ESCRICH, E.; SOLANAS, M. 2016. Dietary lipids differentially modulate the initiation of experimental breast carcinogenesis through their influence on hepatic xenobiotic metabolism and DNA damage in the mammary gland. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. (Sometido para publicación).
- MARCOS-GRAGERA, R., CARDO, X., GALCERAN, J., RIBES, J., IZQUIERDO, A. & BORRAS, J. 2008. [Cancer incidence in Catalonia, 1998-2002]. *Med Clin (Barc)*, 131 Suppl 1, 4-10.
- MARNETT, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-70.
- MARNETT, L. J. 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181-182, 219-22.
- MARTENS, J. W., NIMMIRICH, I., KOENIG, T., LOOK, M. P., HARBECK, N., MODEL, F., KLUTH, A., BOLT-DE VRIES, J., SIEUWERTS, A. M., PORTENGEN, H., MEIJER-VAN GELDER, M. E., PIEPENBROCK, C., OLEK, A., HOFER, H., KIECHLE, M., KLIJN, J. G., SCHMITT, M., MAIER, S. & FOEKENS, J. A. 2005. Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res*, 65, 4101-17.
- MARTIN-MORENO, J. M. 2000. The role of olive oil in lowering cancer risk: is this real gold or simply pinchbeck? *J Epidemiol Community Health*, 54, 726-7.
- MARTIN, M. E., VRANCKX, R., BENASSAYAG, C. & NUNEZ, E. A. 1986. Modifications of the properties of human sex steroid-binding protein by nonesterified fatty acids. *J Biol Chem*, 261, 2954-9.
- MARTIN, R. C., LIU, Q., WO, J. M., RAY, M. B. & LI, Y. 2007. Chemoprevention of carcinogenic progression to esophageal adenocarcinoma by the manganese superoxide dismutase supplementation. *Clin Cancer Res*, 13, 5176-82.
- MARTINEZ-GONZALEZ, M. A., GARCIA-ARELLANO, A., TOLEDO, E., SALAS-SALVADO, J., BUIL-COSIALES, P., CORELLA, D., COVAS, M. I., SCHRODER, H., AROS, F., GOMEZ-GRACIA, E., FIOL, M., RUIZ-GUTIERREZ, V., LAPETRA, J., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., SERRA-MAJEM, L., PINTO, X., MUNOZ, M. A., WARNBERG, J., ROS, E., ESTRUCH, R. & INVESTIGATORS, P. S. 2012. A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial. *PLoS One*, 7, e43134.
- MARTINEZ DE LA VISTORIA, E. M. A., M.; MARTÍN ZUÑIGA, J. 200. *Nutrición y Alimentación. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Ed. McGraw-Hill Interamericana., 109-52.
- MATAIX, J., QUILES, J. L., HUERTAS, J. R., BATTINO, M. & MANAS, M. 1998. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 24, 511-21.
- MATES, J. M., PEREZ-GOMEZ, C. & NUNEZ DE CASTRO, I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32, 595-603.
- MAYNE, S. T. 2006. Women's Health Initiative: complex answers to simple questions on dietary fat and breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 285.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.
- MENENDEZ, J. A., VELLON, L., COLOMER, R. & LUPU, R. 2005. Effect of gamma-linolenic acid on the transcriptional activity of the Her-2/neu (erbB-2) oncogene. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1611-5.
- MERRILL, A. H., JR. & SCHROEDER, J. J. 1993. Lipid modulation of cell function. *Annu Rev Nutr*, 13, 539-59.

- MESSINIS, I. E.,PAPAGEORGIOU, I.,MILINGOS, S.,ASPRODINI, E.,KOLLIOS, G. & SEFERIADIS, K. 2001. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Hum Reprod*, 16, 1827-32.
- MEZA-MIRANDA, E. R.,CAMARGO, A.,RANGEL-ZUNIGA, O. A.,DELGADO-LISTA, J.,GARCIA-RIOS, A.,PEREZ-MARTINEZ, P.,TASSET-CUEVAS, I.,TUNEZ, I.,TINAHONES, F. J.,PEREZ-JIMENEZ, F. & LOPEZ-MIRANDA, J. 2014. Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people. *Age (Dordr)*, 36, 507-17.
- MICHALAKIS, K.,MINTZIORI, G.,KAPRARA, A.,TARLATZIS, B. C. & GOULIS, D. G. 2013. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 62, 457-78.
- MICHEL, V. & BAKOVIC, M. 2007. Lipid rafts in health and disease. *Biol Cell*, 99, 129-40.
- MIKI, Y.,SWENSEN, J.,SHATTUCKEIDENS, D.,FUTREAL, P. A.,HARSHMAN, K.,TAVTIGIAN, S.,LIU, Q. Y.,COCHRAN, C.,BENNETT, L. M.,DING, W.,BELL, R.,ROSENTHAL, J.,HUSSEY, C.,TRAN, T.,MCCLURE, M.,FRYE, C.,HATTIER, T.,PHELPS, R.,HAUGENSTRANO, A.,KATCHER, H.,YAKUMO, K.,GHOLAMI, Z.,SHAFFER, D.,STONE, S.,BAYER, S.,WRAY, C.,BOGDEN, R.,DAYANANTH, P.,WARD, J.,TONIN, P.,NAROD, S.,BRISTOW, P. K.,NORRIS, F. H.,HELVERING, L.,MORRISON, P.,ROSTECK, P.,LAI, M.,BARRETT, J. C.,LEWIS, C.,NEUHAUSEN, S.,CANNONALBRIGHT, L.,GOLDGAR, D.,WISEMAN, R.,KAMB, A. & SKOLNICK, M. H. 1994. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian-Cancer Susceptibility Gene *Brca1*. *Science*, 266, 66-71.
- MILLER, D. M.,BUETTNER, G. R. & AUST, S. D. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, 8, 95-108.
- MILLER, W. R. 2006. Aromatase and the breast: regulation and clinical aspects. *Maturitas*, 54, 335-41.
- MILLS, G. C. 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, 229, 189-97.
- MINEO, C.,JAMES, G. L.,SMART, E. J. & ANDERSON, R. G. 1996. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem*, 271, 11930-5.
- MITJAVILA, M. T.,FANDOS, M.,SALAS-SALVADO, J.,COVAS, M. I.,BORREGO, S.,ESTRUCH, R.,LAMUELA-RAVENTOS, R.,CORELLA, D.,MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.,SANCHEZ, J. M.,BULLO, M.,FITO, M.,TORMOS, C.,CERDA, C.,CASILLAS, R.,MORENO, J. J.,IRADI, A.,ZARAGOZA, C.,CHAVES, J. & SAEZ, G. T. 2013. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr*, 32, 172-8.
- MITRA, A. K.,FARUQUE, F. S. & AVIS, A. L. 2004. Breast cancer and environmental risks: where is the link? *J Environ Health*, 66, 24-32, 40; quiz 41-2.
- MIZUKAMI, Y.,NONOMURA, A.,NOGUCHI, M.,TANIYA, T.,THOMAS, M.,NAKAMURA, S. & MIYAZAKI, I. 1992. 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*, 14, 269-76.
- MONARI, M.,TRINCHERO, A.,CALABRESE, C.,CATTANI, O.,SERRAZANETTI, G. P.,FOSCHI, J.,FABBRI, A.,ZAHLANE, D.,DI FEBO, G.,TONINI, V.,CERVELLERA, M.,TOSI, M. R. & TUGNOLI, V. 2006. Superoxide dismutase in gastric adenocarcinoma: is it a clinical biomarker in the development of cancer? *Biomarkers*, 11, 574-84.
- MOON, E. J. & GIACCIA, A. 2015. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: possible implications in cancer treatment. *Free Radic Biol Med*, 79, 292-9.
- MORAL, R.,ESCRICH, R.,SOLANAS, M.,VELA, E.,RUIZ DE VILLA, M. C. & ESCRICH, E. 2016. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression

- profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. *Eur J Nutr*, 55, 1397-409.
- MORAL, R., SOLANAS, M., GARCIA, G., COLOMER, R. & ESCRICH, E. 2003. Modulation of EGFR and neu expression by n-6 and n-9 high-fat diets in experimental mammary adenocarcinomas. *Oncol Rep*, 10, 1417-24.
- MORAL, R., SOLANAS, M., GARCIA, G., GRAU, L., VELA, E., ESCRICH, R. & ESCRICH, E. 2008. 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*, 20, 429-35.
- MORAL, R., SOLANAS, M., MANZANARES, E. M., HARO, D. & ESCRICH, E. 2004. Influence of DMBA-induced mammary cancer on the liver CPT I, mit HMG-CoA synthase and PPARalpha mRNA expression in rats fed a low or high corn oil diet. *Int J Mol Med*, 14, 283-7.
- MORENO, J. J. 2003. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med*, 35, 1073-81.
- MORENO, V. G., J.R.; SOLER, M.; BOSCH, F.X.; KOGEVINSKA, M.; BORRÀS, J.M. 2001. Estimación de la incidencia de cáncer en España: período 1993-1996. *Gaceta sanitaria* 15, 380-88.
- MOUSSAVI, N., GAVINO, V. & RECEVEUR, O. 2008. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity (Silver Spring)*, 16, 7-15.
- MURPHY, M. P., HOLMGREN, A., LARSSON, N. G., HALLIWELL, B., CHANG, C. J., KALYANARAMAN, B., RHEE, S. G., THORNALLEY, P. J., PARTRIDGE, L., GEMS, D., NYSTROM, T., BELOUSOV, V., SCHUMACKER, P. T. & WINTERBOURN, C. C. 2011. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metabolism*, 13, 361-366.
- MURRAY, M. 2007. Role of signalling systems in the effects of dietary factors on the expression of mammalian CYPs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3, 185-96.
- MURUGAN, R. S., MOHAN, K. V., UCHIDA, K., HARA, Y., PRATHIBA, D. & NAGINI, S. 2007. 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*, 42, 352-61.
- MUSGROVE, E. A. & SUTHERLAND, R. L. 2009. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 9, 631-43.
- NAGASAWA, H., YANAI, R. & TANIGUCHI, H. 1976. Importance of mammary gland DNA synthesis on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res*, 36, 2223-6.
- NAKAGAWA, Y. 2004. Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor. *Biol Pharm Bull*, 27, 956-60.
- NAKAYAMA, M., JU, H. R., SUGANO, M., HIROSE, N., UEKI, T., DOI, F. & EYNARD, A. R. 1993. Effect of dietary fat and cholesterol on dimethylbenz[a]-anthracene-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Anticancer Res*, 13, 691-8.
- NAROD, S. A. & FOULKES, W. D. 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*, 4, 665-76.
- NATHANSON, K. N., WOOSTER, R. & WEBER, B. L. 2001. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nature Medicine*, 7, 552-556.
- NAVARRO, V. M., GOTTSCH, M. L., CHAVKIN, C., OKAMURA, H., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci*, 29, 11859-66.

## Bibliografía

- NELSON, B. H. 2008. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunological Reviews*, 222, 101-116.
- NEMOTO, N. 1986. Marked activation of benzo[a]pyrene to protein-binding forms in the presence of unsaturated fatty acids and heme-compounds. *Carcinogenesis*, 7, 267-71.
- NETTER, F. H. 1982. Anatomía y patología de la glándula mamaria. En el "sistema reproductor". Colección Ciba de ilustraciones médicas. Salvat., II, 243-63.
- NEWMARK, H. L. 1999. Squalene, olive oil, and cancer risk - Review and hypothesis. *Cancer Prevention: Novel Nutrient and Pharmaceutical Developments*, 889, 193-203.
- NGUYEN, T., NIOI, P. & PICKETT, C. B. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, 284, 13291-5.
- NIEDERNHOFER, L. J., DANIELS, J. S., ROUZER, C. A., GREENE, R. E. & MARNETT, L. J. 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*, 278, 31426-33.
- NIGGLI, V. & BURGER, M. M. 1987. Interaction of the cytoskeleton with the plasma membrane. *J Membr Biol*, 100, 97-121.
- NOEMAN, S. A., HAMOODA, H. E. & BAALASH, A. A. 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr*, 3, 17.
- NOGUCHI, M., TANIYA, T., KOYASAKI, N., KUMAKI, T., MIYAZAKI, I. & MIZUKAMI, Y. 1991. 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*, 51, 2683-9.
- NOMURA, K., IMAI, H., KOUMURA, T., ARAI, M. & NAKAGAWA, Y. 1999. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem*, 274, 29294-302.
- NOREN HOOTEN, N., KOMPANIEZ, K., BARNES, J., LOHANI, A. & EVANS, M. K. 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem*, 286, 44679-90.
- OBERLEY, L. W. 2005. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother*, 59, 143-8.
- OBERLEY, L. W., BIZE, I. B., SAHU, S. K., LEUTHAUSER, S. W. & GRUBER, H. E. 1978. Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver, and H6 hepatoma. *J Natl Cancer Inst*, 61, 375-9.
- OBERLEY, L. W. & BUETTNER, G. R. 1979. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*, 39, 1141-9.
- OBERLEY, T. D. & OBERLEY, L. W. 1997. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol*, 12, 525-35.
- OCHOA-HERRERA, J. J., HUERTAS, J. R., QUILES, J. L. & MATAIX, J. 2001. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J Nutr Biochem*, 12, 357-364.
- OI-KANO, Y., KAWADA, T., WATANABE, T., KOYAMA, F., WATANABE, K., SENBONGI, R. & IWAI, K. 2007. Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Biochem*, 18, 685-92.
- OJEDA, S. R., LOMNICZI, A., MASTRONARDI, C., HEGER, S., ROTH, C., PARENT, A. S., MATAGNE, V. & MUNGENAST, A. E. 2006. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology*, 147, 1166-74.

- OJEDA, S. R., LOMNICZI, A. & SANDAU, U. S. 2008. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol*, 20, 732-42.
- OLEAGA, C., GARCIA, M., SOLE, A., CIUDAD, C. J., IZQUIERDO-PULIDO, M. & NOE, V. 2012. CYP1A1 is overexpressed upon incubation of breast cancer cells with a polyphenolic cocoa extract. *Eur J Nutr*, 51, 465-76.
- OLIVA, M. R., RIPOLL, F., MUNIZ, P., IRADI, A., TRULLENQUE, R., VALLS, V., DREHMER, E. & SAEZ, G. T. 1997. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog*, 18, 232-43.
- OLTRA, A. M., CARBONELL, F., TORMOS, C., IRADI, A. & SAEZ, G. T. 2001. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med*, 30, 1286-92.
- OMIECINSKI, C. J., VANDEN HEUVEL, J. P., PERDEW, G. H. & PETERS, J. M. 2011. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci*, 120 Suppl 1, S49-75.
- OWEN, R. W., GIACOSA, A., HULL, W. E., HAUBNER, R., SPIEGELHALDER, B. & BARTSCH, H. 2000a. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*, 36, 1235-47.
- OWEN, R. W., GIACOSA, A., HULL, W. E., HAUBNER, R., WURTELE, G., SPIEGELHALDER, B. & BARTSCH, H. 2000b. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol*, 1, 107-12.
- OWEN, R. W., HAUBNER, R., WURTELE, G., HULL, E., SPIEGELHALDER, B. & BARTSCH, H. 2004. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, 13, 319-26.
- PACKER, L. & CADENAS, E. 2007. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radic Res*, 41, 951-2.
- PADMAVATHI, R., SENTHILNATHAN, P. & SAKTHISEKARAN, D. 2006. 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*, 143, 349-54.
- PAOLISSO, G., RIZZO, M. R., MONE, C. M., TAGLIAMONTE, M. R., GAMBARDELLA, A., RIONDINO, M., CARELLA, C., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. 1998. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 48, 291-7.
- PAPA, L., MANFREDI, G. & GERMAIN, D. 2014. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes Cancer*, 5, 15-21.
- PARKER, B. S., ARGANI, P., COOK, B. P., LIANGFENG, H., CHARTRAND, S. D., ZHANG, M., SAHA, S., BARDELLI, A., JIANG, Y., ST MARTIN, T. B., NACHT, M., TEICHER, B. A., KLINGER, K. W., SUKUMAR, S. & MADDEN, S. L. 2004. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, 64, 7857-66.
- PARKIN, D. M. W., S.L.; FERLAY, J.; TEPPA, L.; THOMAS, D.B. 2002. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ*, VIII.
- PARSA, P. & PARSA, B. 2009. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 10, 545-50.
- PATRA, S. K. 2008. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1785, 182-206.
- PAULSEN, C. E. & CARROLL, K. S. 2013. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev*, 113, 4633-79.
- PECKHAM, J. C. 1980. *Experimental Oncology. The laboratory rat*, II.
- PEJIC, S., KASAPOVIC, J., TODOROVIC, A., STOJILJKOVIC, V. & PAJOVIC, S. B. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of patients with uterine myoma,

- endometrial polypus, hyperplastic and malignant endometrium. *Biol Res*, 39, 619-29.
- PENDYALA, L.,VELAGAPUDI, S.,TOTH, K.,ZDANOWICZ, J.,GLAVES, D.,SLOCUM, H.,PEREZ, R.,HUBEN, R.,CREAVEN, P. J. & RAGHAVAN, D. 1997. Translational studies of glutathione in bladder cancer cell lines and human specimens. *Clin Cancer Res*, 3, 793-8.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, F. R., J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, P.; LOPEZ-SEGURA, F.; LOPEZ-MIRANDA, J. 2003. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Bratisl. Lek. Listy*, 104, 218-21.
- PERRY, R. R.,MAZETTA, J. A.,LEVIN, M. & BARRANCO, S. C. 1993. Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer*, 72, 783-7.
- PETKAU, A.,MONASTERSKI, L. G.,KELLY, K. & FRIESEN, H. G. 1977. Modification of superoxide dismutase in rat mammary carcinoma. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 17, 125-32.
- PFEIFER, H.,CONRAD, M.,ROETHLEIN, D.,KYRIAKOPOULOS, A.,BRIELMEIER, M.,BORNKAMM, G. W. & BEHNE, D. 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J*, 15, 1236-8.
- PIERS, L. S.,WALKER, K. Z.,STONEY, R. M.,SOARES, M. J. & O'DEA, K. 2003. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. *Br J Nutr*, 90, 717-27.
- PINCHUK, I.,SCHNITZER, E. & LICHTENBERG, D. 1998. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta*, 1389, 155-72.
- PINHEIRO, J. C. B., D.M. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag, NY.
- PINILLA, L.,AGUILAR, E.,DIEGUEZ, C.,MILLAR, R. P. & TENA-SEMPERE, M. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 92, 1235-316.
- PIZZIMENTI, S.,CIAMPORCERO, E.,DAGA, M.,PETTAZZONI, P.,ARCARO, A.,CETRANGOLO, G.,MINELLI, R.,DIANZANI, C.,LEPORE, A.,GENTILE, F. & BARRERA, G. 2013. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol*, 4, 242.
- PODMORE, I. D.,GRIFFITHS, H. R.,HERBERT, K. E.,MISTRY, N.,MISTRY, P. & LUNEC, J. 1998. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392, 559-559.
- POLLAN, M.,PASTOR-BARRIUSO, R.,ARDANAZ, E.,ARGUELLES, M.,MARTOS, C.,GALCERAN, J.,SANCHEZ-PEREZ, M. J.,CHIRLAQUE, M. D.,LARRANAGA, N.,MARTINEZ-COBO, R.,TOBALINA, M. C.,VIDAL, E.,MARCOS-GRAGERA, R.,MATEOS, A.,GARAU, I.,ROJAS-MARTIN, M. D.,JIMENEZ, R.,TORRELLA-RAMOS, A.,PERUCHA, J.,PEREZ-DE-RADA, M. E.,GONZALEZ, S.,RABANAQUE, M. J.,BORRAS, J.,NAVARRO, C.,HERNANDEZ, E.,IZQUIERDO, A.,LOPEZ-ABENTE, G. & MARTINEZ, C. 2009. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst*, 101, 1584-91.
- POOLE, L. B.,KARPLUS, P. A. & CLAIBORNE, A. 2004. Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 325-47.
- PORTER, W. L. 1993. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol Ind Health*, 9, 93-122.
- POWER, K. A. & THOMPSON, L. U. 2003. Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat*, 81, 209-21.
- POWIS, G.,MUSTACICH, D. & COON, A. 2000. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med*, 29, 312-22.

- PRAT, A. & PEROU, C. M. 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5, 5-23.
- PRENTICE, R. L., CAAN, B., CHLEBOWSKI, R. T., PATTERSON, R., KULLER, L. H., OCKENE, J. K., MARGOLIS, K. L., LIMACHER, M. C., MANSON, J. E., PARKER, L. M., PASKETT, E., PHILLIPS, L., ROBBINS, J., ROSSOUW, J. E., SARTO, G. E., SHIKANY, J. M., STEFANICK, M. L., THOMSON, C. A., VAN HORN, L., VITOLINS, M. Z., WACTAWSKI-WENDE, J., WALLACE, R. B., WASSERTHEIL-SMOLLER, S., WHITLOCK, E., YANO, K., ADAMS-CAMPBELL, L., ANDERSON, G. L., ASSAF, A. R., BERESFORD, S. A., BLACK, H. R., BRUNNER, R. L., BRZYSKI, R. G., FORD, L., GASS, M., HAYS, J., HEBER, D., HEISS, G., HENDRIX, S. L., HSIA, J., HUBBELL, F. A., JACKSON, R. D., JOHNSON, K. C., KOTCHEN, J. M., LACROIX, A. Z., LANE, D. S., LANGER, R. D., LASSER, N. L. & HENDERSON, M. M. 2006. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA*, 295, 629-42.
- PRIEME, H., LOFT, S., NYSSONEN, K., SALONEN, J. T. & POULSEN, H. E. 1997. No effect of supplementation with vitamin E, ascorbic acid, or coenzyme Q10 on oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion in smokers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 503-507.
- PRIOR, I. A. & HANCOCK, J. F. 2001. Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci*, 114, 1603-8.
- PUNNONEN, R., KUDO, R., PUNNONEN, K., HIETANEN, E., KUOPPALA, T., KAINULAINEN, H., SATO, K. & AHOTUPA, M. 1993. Activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrial cancer. *Eur J Cancer*, 29A, 266-9.
- QIAN, B. Z. & POLLARD, J. W. 2010. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141, 39-51.
- QIN, X. Y., ZAHA, H., NAGANO, R., YOSHINAGA, J., YONEMOTO, J. & SONE, H. 2011. 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*, 206, 152-7.
- QUILES, J. L., FARQUHARSON, A. J., SIMPSON, D. K., GRANT, I. & WAHLE, K. W. 2002. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr*, 88, 225-34; discussion 223-4.
- RADAK, Z. & BOLDOGH, I. 2010. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: Links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 587-596.
- RAFFEL, J., BHATTACHARYYA, A. K., GALLEGOS, A., CUI, H., EINSPAHR, J. G., ALBERTS, D. S. & POWIS, G. 2003. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med*, 142, 46-51.
- RAHMAN, I., KODE, A. & BISWAS, S. K. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protocols*, 1, 3159-3165.
- RAHMAN, K. M., SUGIE, S., TANAKA, T., MORI, H. & REDDY, B. S. 2001. Effect of types and amount of dietary fat during the initiation phase of hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer*, 39, 220-5.
- RAJENDRAN, L. & SIMONS, K. 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, 118, 1099-102.
- RAO, C. V., NEWMARK, H. L. & REDDY, B. S. 1998. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, 19, 287-90.

- RAY, A., NKHATA, K. J., GRANDE, J. P. & CLEARY, M. P. 2007. Diet-induced obesity and mammary tumor development in relation to estrogen receptor status. *Cancer Lett*, 253, 291-300.
- RAZANI, B., WOODMAN, S. E. & LISANTI, M. P. 2002. Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, 54, 431-467.
- REHMAN, A., BOURNE, L. C., HALLIWELL, B. & RICE-EVANS, C. A. 1999. Tomato consumption modulates oxidative DNA damage in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262, 828-831.
- REID, S. E., MURTHY, M. S., KAUFMAN, M. & SCANLON, E. F. 1996. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br J Surg*, 83, 1037-46.
- REMACLE, J., LAMBERT, D., RAES, M., PIGEOLET, E., MICHIELS, C. & TOUSSAINT, O. 1992. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem J*, 286 ( Pt 1), 41-6.
- REN, D., VILLENEUVE, N. F., JIANG, T., WU, T., LAU, A., TOPPIN, H. A. & ZHANG, D. D. 2011. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 1433-8.
- REUTER, S., GUPTA, S. C., CHATURVEDI, M. M. & AGGARWAL, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49, 1603-16.
- REYES, N., IATROPOULOS, M., MITTELMAN, A. & GELIEBTER, J. 2002. Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate. *Eur J Cancer Prev*, 11 Suppl 2, S37-42.
- REYES, N., REYES, I., TIWARI, R. & GELIEBTER, J. 2004. Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett*, 209, 25-35.
- RHEE, S. G., YANG, K. S., KANG, S. W., WOO, H. A. & CHANG, T. S. 2005. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal*, 7, 619-26.
- ROA, J., AGUILAR, E., DIEGUEZ, C., PINILLA, L. & TENA-SEMPERE, M. 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*, 29, 48-69.
- ROCK, C. L. 2003. Diet and breast cancer: can dietary factors influence survival? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8, 119-32.
- RODRIGUEZ DE FONSECA, F., NAVARRO, M., GOMEZ, R., ESCUREDO, L., NAVA, F., FU, J., MURILLO-RODRIGUEZ, E., GIUFFRIDA, A., LOVERME, J., GAETANI, S., KATHURIA, S., GALL, C. & PIOMELLI, D. 2001. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414, 209-12.
- ROGERS, A. E. 1979. Nutrition. The laboratory rat, I, 123-52.
- ROMAGUERA, D., NORAT, T., VERGNAUD, A. C., MOUW, T., MAY, A. M., AGUDO, A., BUCKLAND, G., SLIMANI, N., RINALDI, S., COUTO, E., CLAVEL-CHAPELON, F., BOUTRON-ROUAULT, M. C., COTTET, V., ROHRMANN, S., TEUCHER, B., BERGMANN, M., BOEING, H., TJONNELAND, A., HALKJAER, J., JAKOBSEN, M. U., DAHM, C. C., TRAVIER, N., RODRIGUEZ, L., SANCHEZ, M. J., AMIANO, P., BARRICARTE, A., HUERTA, J. M., LUAN, J., WAREHAM, N., KEY, T. J., SPENCER, E. A., ORFANOS, P., NASKA, A., TRICHOPOULOU, A., PALLI, D., AGNOLI, C., MATTIELLO, A., TUMINO, R., VINEIS, P., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., BUCHNER, F. L., MANJER, J., WIRFALT, E., JOHANSSON, I., HELLSTROM, V., LUND, E., BRAATEN, T., ENGESET, D., ODYSSEOS, A., RIBOLI, E. & PEETERS, P. H. 2010. Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am J Clin Nutr*, 92, 912-21.
- ROMEU, M., MULERO, M., GIRALT, M., FOLCH, J., NOGUES, M. R., TORRES, A., FORTUNO, A., SUREDA, F. X., CABRE, M., PATERNAIN, J. L. & MALLOL, J. 2002. Parameters related

- to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat. *Life Sci*, 71, 1739-49.
- ROMIEU, I., GARCIA-ESTEBAN, R., SUNYER, J., RIOS, C., ALCARAZ-ZUBELDIA, M., VELASCO, S. R. & HOLGUIN, F. 2008. The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM(2.5). *Environ Health Perspect*, 116, 1237-42.
- RONAI, Z., LAU, Y. Y. & COHEN, L. A. 1991. Dietary N-3 fatty acids do not affect induction of Ha-ras mutations in mammary glands of NMU-treated rats. *Mol Carcinog*, 4, 120-8.
- RONAI, Z., TILLOTSON, J. & COHEN, L. 1995. Effect of dietary fatty acids on gene expression in breast cells. *Adv Exp Med Biol*, 375, 85-95.
- ROSE, D. P. 1997. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am J Clin Nutr*, 66, 1513S-1522S.
- ROSE, D. P. & CONNOLLY, J. M. 1990. Effects of Fatty-Acids and Inhibitors of Eicosanoid Synthesis on the Growth of a Human Breast-Cancer Cell-Line in Culture. *Cancer Research*, 50, 7139-7144.
- ROSE, D. P., HATALA, M. A., CONNOLLY, J. M. & RAYBURN, J. 1993. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res*, 53, 4686-90.
- ROSEN, J. M., HUMPHREYS, R., KRNACIK, S., JUO, P. & RAUGHT, B. 1994. The regulation of mammary gland development by hormones, growth factors, and oncogenes. *Prog Clin Biol Res*, 387, 95-111.
- ROSEN JM, R. D., GUYETTE W, MATUSIK RJ. 1980. Steroid-hormone modulation of prolactin action in the rat mammary gland. *Gene regulation by Steroid Hormones*. Springer-Verlag, 58-77.
- ROSEN, P. P. O. H. A. 1992. Tumors of the mammary gland. *Anatomy*, 11-13.
- ROSNER, B., COLDITZ, G. A. & WILLET, W. C. 1994. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 139, 819-35.
- ROSSI, C., DI LENA, A., LA SORDA, R., LATTANZIO, R., ANTOLINI, L., PATASSINI, C., PIANTELLI, M. & ALBERTI, S. 2008. Intestinal tumour chemoprevention with the antioxidant lipoic acid stimulates the growth of breast cancer. *Eur J Cancer*, 44, 2696-704.
- ROUSE, I. L., ARMSTRONG, B. K. & BEILIN, L. J. 1982. Vegetarian diet, lifestyle and blood pressure in two religious populations. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 9, 327-30.
- ROWET, H. G. Q. 1976. *Guías de disección III - La rata (con notas sobre el ratón)*. Colección Guías Urania, URANIA SA.
- RUDEL, R. A., FENTON, S. E., ACKERMAN, J. M., EULING, S. Y. & MAKRIS, S. L. 2011. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ Health Perspect*, 119, 1053-61.
- RUIZ-GUTIERREZ, V., PEREZ-ESPINOSA, A., VAZQUEZ, C. M. & SANTA-MARIA, C. 1999. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br J Nutr*, 82, 233-41.
- RUSSO, I. & RUSSO, J. 1994. Role of HCG and inhibin in breast-cancer (review). *Int J Oncol*, 4, 297-306.
- RUSSO, I. H. & RUSSO, J. 1996a. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, 104, 938-67.
- RUSSO, J., CALAF, G., SOHI, N., TAHIN, Q., ZHANG, P. L., ALVARADO, M. E., ESTRADA, S. & RUSSO, I. H. 1993. Critical steps in breast carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 698, 1-20.
- RUSSO, J., GUSTERSON, B. A., ROGERS, A. E., RUSSO, I. H., WELLINGS, S. R. & VAN ZWIETEN, M. J. 1990. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest*, 62, 244-78.

## Bibliografía

- RUSSO, J. & RUSSO, I. H. 1987. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest*, 57, 112-37.
- RUSSO, J. & RUSSO, I. H. 1996b. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat*, 39, 7-20.
- RUSSO, J. & RUSSO, I. H. 1997. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)*, 57 Suppl 2, 81-91.
- RUSSO, J. & RUSSO, I. H. 2004. Development of the human breast. *Maturitas*, 49, 2-15.
- RUSSO, J., TAY, L. K., CIOCCA, D. R. & RUSSO, I. H. 1983. Molecular and cellular basis of the mammary gland susceptibility to carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 49, 185-99.
- RUSSO, J. R., I. H. 1997. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B. Aires)*, 57, 81-91.
- SADI, G., BOZAN, D. & YILDIZ, H. B. 2014. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem*, 393, 111-22.
- SAFFORD, S. E., OBERLEY, T. D., URANO, M. & ST CLAIR, D. K. 1994. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*, 54, 4261-5.
- SAGER, R. 1989. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 246, 1406-12.
- SAHARAN, S. & MANDAL, P. K. 2014. The emerging role of glutathione in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 40, 519-29.
- SAKAI, J., LI, J., SUBRAMANIAN, K. K., MONDAL, S., BAJRAMI, B., HATTORI, H., JIA, Y., DICKINSON, B. C., ZHONG, J., YE, K., CHANG, C. J., HO, Y. S., ZHOU, J. & LUO, H. R. 2012. Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity*, 37, 1037-49.
- SALZMAN, R., KANKOVA, K., PACAL, L., TOMANDL, J., HORAKOVA, Z. & KOSTRICA, R. 2007. Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasma*, 54, 321-5.
- SAMIEC, P. S., DREWS-BOTSCH, C., FLAGG, E. W., KURTZ, J. C., STERNBERG, P., JR., REED, R. L. & JONES, D. P. 1998. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 24, 699-704.
- SANCHEZ, M., TORRES, J. V., TORMOS, C., IRADI, A., MUNIZ, P., ESPINOSA, O., SALVADOR, A., RODRIGUEZ-DELGADO, J., FANDOS, M. & SAEZ, G. T. 2006. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett*, 233, 28-35.
- SANTEN, R. J. 1993. Hipogonadismo humano. *Endocrinología de la reproducción. Editorial Médica Panamericana*, 765-820.
- SANTIAGO, L. A., OSATO, J. A., LIU, J. & MORI, A. 1993. Age-related increases in superoxide dismutase activity and thiobarbituric acid-reactive substances: effect of biocatalyzer in aged rat brain. *Neurochem Res*, 18, 711-7.
- SANTORO, N., FILICORI, M. & CROWLEY, W. F., JR. 1986. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev*, 7, 11-23.
- SATOH, H., MORIGUCHI, T., TAKAI, J., EBINA, M. & YAMAMOTO, M. 2013. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res*, 73, 4158-68.
- SAU, A., PELLIZZARI TREGNO, F., VALENTINO, F., FEDERICI, G. & CACCURI, A. M. 2010. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys*, 500, 116-22.
- SAVASKAN, N. E., BORCHERT, A., BRAUER, A. U. & KUHN, H. 2007. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of

- enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic Biol Med*, 43, 191-201.
- SAVITSKY, P. A. & FINKEL, T. 2002. Redox regulation of Cdc25C. *J Biol Chem*, 277, 20535-40.
- SCACCINI, C., NARDINI, M., D'AQUINO, M., GENTILI, V., DI FELICE, M. & TOMASSI, G. 1992. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res*, 33, 627-33.
- SCHADENDORF, D., ZUBERBIER, T., DIEHL, S., SCHADENDORF, C. & CZARNETZKI, B. M. 1995. Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma. *Melanoma Res*, 5, 351-3.
- SCHAUR, R. J., SIEMS, W., BRESGEN, N. & ECKL, P. M. 2015. 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules*, 5, 2247-337.
- SCHLEY, P. D., BRINDLEY, D. N. & FIELD, C. J. 2007. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr*, 137, 548-53.
- SCHMITZ, G. & ECKER, J. 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47, 147-155.
- SCHULZ, M., HOFFMANN, K., WEIKERT, C., NOTHLINGS, U., SCHULZE, M. B. & BOEING, H. 2008. 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)-Potsdam Study. *Br J Nutr*, 100, 942-6.
- SECHI, G., DELEDDA, M. G., BUA, G., SATTA, W. M., DEIANA, G. A., PES, G. M. & ROSATI, G. 1996. Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 20, 1159-70.
- SEILER, A., SCHNEIDER, M., FORSTER, H., ROTH, S., WIRTH, E. K., CULMSEE, C., PLESNILA, N., KREMMER, E., RADMARK, O., WURST, W., BORNKAMM, G. W., SCHWEIZER, U. & CONRAD, M. 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 8, 237-48.
- SEKIMIZU, K. 1994. Interactions between DNA replication-related proteins and phospholipid vesicles in vitro. *Chem Phys Lipids*, 73, 223-30.
- SERRANO, A., PAVON, F. J., TOVAR, S., CASANUEVA, F., SENARIS, R., DIEGUEZ, C. & DE FONSECA, F. R. 2011. Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology*, 60, 593-601.
- SESSO, H. D., BURING, J. E., CHRISTEN, W. G., KURTH, T., BELANGER, C., MACFADYEN, J., BUBES, V., MANSON, J. E., GLYNN, R. J. & GAZIANO, J. M. 2008. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, 300, 2123-33.
- SETH, L. R., KHARB, S. & KHARB, D. P. 2003. Serum biochemical markers in carcinoma breast. *Indian J Med Sci*, 57, 350-4.
- SHI, D. Y., LIU, H. L., STERN, J. S., YU, P. Z. & LIU, S. L. 2008. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in hepatoma cells via the PTEN/Akt pathway. *FEBS Lett*, 582, 1667-71.
- SHIELDS, J. D., KOURTIS, I. C., TOMEI, A. A., ROBERTS, J. M. & SWARTZ, M. A. 2010. Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21. *Science*, 328, 749-752.
- SHIN, J. H., HUR, J. Y., SEO, H. S., JEONG, Y. A., LEE, J. K., OH, M. J., KIM, T., SAW, H. S. & KIM, S. H. 2007. The ratio of estrogen receptor alpha to estrogen receptor beta in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 72, 592-9.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62, 10-29.

- SIERI, S.,KROGH, V.,FERRARI, P.,BERRINO, F.,PALA, V.,THIEBAUT, A. C.,TJONNELAND, A.,OLSEN, A.,OVERVAD, K.,JAKOBSEN, M. U.,CLAVEL-CHAPELON, F.,CHAJES, V.,BOUSTRON-RUAULT, M. C.,KAAKS, R.,LINSEISEN, J.,BOEING, H.,NOTHLINGS, U.,TRICHOPOULOU, A.,NASKA, A.,LAGIOU, P.,PANICO, S.,PALLI, D.,VINEIS, P.,TUMINO, R.,LUND, E.,KUMLE, M.,SKEIE, G.,GONZALEZ, C. A.,ARDANAZ, E.,AMIANO, P.,TORMO, M. J.,MARTINEZ-GARCIA, C.,QUIROS, J. R.,BERGLUND, G.,GULLBERG, B.,HALLMANS, G.,LENNER, P.,BUENO-DE-MESQUITA, H. B.,VAN DUJNHOFEN, F. J.,PEETERS, P. H.,VAN GILS, C. H.,KEY, T. J.,CROWE, F. L.,BINGHAM, S.,KHAW, K. T.,RINALDI, S.,SLIMANI, N.,JENAB, M.,NORAT, T. & RIBOLI, E. 2008. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*, 88, 1304-12.
- SIES, H. 1985. Oxidative Stress. Academic Press, London, 1-507.
- SIES, H.,STAHL, W. & SEVANIAN, A. 2005. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr*, 135, 969-72.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-72.
- SIMONS, K. & VAZ, W. L. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33, 269-95.
- SINGER, B. & KUSMIEREK, J. T. 1982. Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem*, 51, 655-93.
- SINGH, J.,HAMID, R. & REDDY, B. S. 1997. 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*, 57, 253-8.
- SINHA, R. J.,SINGH, R.,MEHROTRA, S. & SINGH, R. K. 2009. Implications of free radicals and antioxidant levels in carcinoma of the breast: a never-ending battle for survival. *Indian J Cancer*, 46, 146-50.
- SISK, C. L.,RICHARDSON, H. N.,CHAPPELL, P. E. & LEVINE, J. E. 2001. In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. *Endocrinology*, 142, 2929-36.
- SKRZYDLEWSKA, E.,STANKIEWICZ, A.,SULKOWSKA, M.,SULKOWSKI, S. & KASACKA, I. 2001. Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J Toxicol Environ Health A*, 64, 213-22.
- SLYSKOVA, J.,LANGIE, S. A.,COLLINS, A. R. & VODICKA, P. 2014. Functional evaluation of DNA repair in human biopsies and their relation to other cellular biomarkers. *Front Genet*, 5, 116.
- SMITH, A. R.,SHENVI, S. V.,WIDLANSKY, M.,SUH, J. H. & HAGEN, T. M. 2004. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11, 1135-46.
- SMITH, T. J.,YANG, G. Y.,SERIL, D. N.,LIAO, J. & KIM, S. 1998. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, 19, 703-706.
- SNYDERWINE, E. G.,DAVIS, C. D.,SCHUT, H. A. & ROBERTS-THOMSON, S. J. 1998. Proliferation, development and DNA adduct levels in the mammary gland of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and a high fat diet. *Carcinogenesis*, 19, 1209-15.
- SOINI, Y.,KAHLOS, K.,NAPANKANGAS, U.,KAARTEENAHO-WIIK, R.,SAILY, M.,KOISTINEN, P.,PAAKKO, P.,HOLMGREN, A. & KINNULA, V. L. 2001. Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7, 1750-7.
- SOLANAS, M.,ESCRICH, E.,ROUZAUT, A.,COSTA, I.,MARTINEZ, A. & NOTARIO, V. 2002a. Deregulated expression of the PCPH proto-oncogene in rat mammary tumors induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol Carcinog*, 33, 219-27.

- SOLANAS, M., GRAU, L., MORAL, R., VELA, E., ESCRICH, R. & ESCRICH, E. 2010. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. *Carcinogenesis*, 31, 871-9.
- SOLANAS, M., HURTADO, A., COSTA, I., MORAL, R., MENENDEZ, J. A., COLOMER, R. & ESCRICH, E. 2002b. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA-induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. *Int J Oncol*, 21, 745-53.
- SOLANAS, M., MORAL, R. & ESCRICH, E. 2001. The stimulating effect of a high-fat n-6 polyunsaturated diet on rat DMBA-induced mammary tumors is not related to changes in c-Ha-ras1 mRNA tumor expression. *Nutrition Research*, 21, 1261-1273.
- SOLANAS, M. M., R.; COLOMER, R.; ESCRICH, E. 2000. Effects of dietary (n-6) polyunsaturated lipids on experimental mammary carcinogenesis. *J. Women's cancer*, 2, 67-72.
- SOLANAS, M. M., R.; ESCRICH, E. 2002. Mecanismos de activación de protooncogenes. Papel de la sobreexpresión génica en cáncer de mama. *Oncología*, 20, 243-57.
- SOLIMAN, A. S., VULIMIRI, S. V., KLEINER, H. E., SHEN, J., EISSA, S., MORAD, M., TAHA, H., LUKMANJI, F., LI, D., JOHNSTON, D. A., LO, H.-H., LAU, S., DIGIOVANNI, J. & BONDY, M. L. 2004. High levels of oxidative DNA damage in lymphocyte DNA of premenopausal breast cancer patients from Egypt. *International Journal of Environmental Health Research*, 14, 121-134.
- SOLOMONSON, L. P., LIEPKALNS, V. A. & SPECTOR, A. A. 1976. Changes in (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity of Ehrlich ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry*, 15, 892-7.
- SOMASUNDAR, P., MCFADDEN, D. W., HILEMAN, S. M. & VONA-DAVIS, L. 2004. Leptin is a growth factor in cancer. *J Surg Res*, 116, 337-49.
- SOSPEDRA, I., MORAL, R., ESCRICH, R., SOLANAS, M., VELA, E. & ESCRICH, E. 2015. Effect of High Fat Diets on Body Mass, Oleyethanolamide Plasma Levels and Oxytocin Expression in Growing Rats. *Journal of Food Science*, 80, H1425-H1431.
- SOTIRIOU, C. & PUSZTAI, L. 2009. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*, 360, 790-800.
- SOTO-GUZMAN, A., NAVARRO-TITO, N., CASTRO-SANCHEZ, L., MARTINEZ-OROZCO, R. & SALAZAR, E. P. 2010. Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 27, 505-15.
- SPECTOR, A. A. & BURNS, C. P. 1987. Biological and Therapeutic Potential of Membrane Lipid Modification in Tumors. *Cancer Research*, 47, 4529-4537.
- SPENCER, L., MANN, C., METCALFE, M., WEBB, M., POLLARD, C., SPENCER, D., BERRY, D., STEWARD, W. & DENNISON, A. 2009. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *Eur J Cancer*, 45, 2077-86.
- SRIVASTAVA, P., RUSSO, J., MGBONYEBI, O. P. & RUSSO, I. H. 1998. Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells. *Anticancer Res*, 18, 4003-10.
- ST CLAIR, D. K. & HOLLAND, J. C. 1991. Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res*, 51, 939-43.
- STAAL, F. J., ROEDERER, M., HERZENBERG, L. A. & HERZENBERG, L. A. 1990. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9943-7.
- STADTMAN, E. R. 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 928, 22-38.

- STARK, A. H. & MADAR, Z. 2002. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev*, 60, 170-6.
- STEINMETZ, K. A. & POTTER, J. D. 1991. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control*, 2, 427-42.
- STOLL, B. A. 2002. N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr*, 87, 193-8.
- STULNIG, T. M. 2003. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: Mechanisms and effects. *International Archives of Allergy and Immunology*, 132, 310-321.
- STURLAN, S.,BAUMGARTNER, M.,ROTH, E. & BACHLEITNER-HOFMANN, T. 2003. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood*, 101, 4990-7.
- SUBCOMITEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION, C. O. A. N., BOARD AGRECULTURE AND RENEWABLE RESOURCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1978. Nutrient requirements of laboratory animals. *Nutrient requirements of Domestic Animals*, 6-35.
- SUMIDA, C.,GRABER, R. & NUNEZ, E. 1993. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 48, 117-22.
- SUN, Y.,COLBURN, N. H. & OBERLEY, L. W. 1993. Decreased expression of manganese superoxide dismutase mRNA and protein after immortalization and transformation of mouse liver cells. *Oncol Res*, 5, 127-32.
- SUNDRAM, K.,KHOR, H. T.,ONG, A. S. & PATHMANATHAN, R. 1989. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res*, 49, 1447-51.
- SYLVESTER, P. W.,RUSSELL, M.,IP, M. M. & IP, C. 1986. 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*, 46, 757-62.
- TANAKA, Y.,ALEKSUNES, L. M.,YEAGER, R. L.,GYAMFI, M. A.,ESTERLY, N.,GUO, G. L. & KLAASSEN, C. D. 2008. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*, 325, 655-64.
- TANEJA, P.,MAGLIC, D.,KAI, F.,ZHU, S.,KENDIG, R. D.,FRY, E. A. & INOUE, K. 2010. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol*, 4, 15-34.
- TARANU, I.,GRAS, M.,PISTOL, G. C.,MOTIU, M.,MARIN, D. E.,LEFTER, N.,ROPOTA, M. & HABEANU, M. 2014. omega-3 PUFA rich camelina oil by-products improve the systemic metabolism and spleen cell functions in fattening pigs. *PLoS One*, 9, e110186.
- TAVANI, A.,PELUCCHI, C.,PARPINEL, M.,NEGRI, E.,FRANCESCHI, S.,LEVI, F. & LA VECCHIA, C. 2003. n-3 polyunsaturated fatty acid intake and cancer risk in Italy and Switzerland. *Int J Cancer*, 105, 113-6.
- TEOH-FITZGERALD, M. L.,FITZGERALD, M. P.,JENSEN, T. J.,FUTSCHER, B. W. & DOMANN, F. E. 2012. Genetic and epigenetic inactivation of extracellular superoxide dismutase promotes an invasive phenotype in human lung cancer by disrupting ECM homeostasis. *Mol Cancer Res*, 10, 40-51.
- TERASAWA, E.,KURIAN, J. R.,GUERRIERO, K. A.,KENEALY, B. P.,HUTZ, E. D. & KEEN, K. L. 2010. Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J Neuroendocrinol*, 22, 630-8.
- TERRY, P. D. & ROHAN, T. E. 2002. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11, 953-71.

- THABUIS, C.,TISSOT-FAVRE, D.,BEZELGUES, J. B.,MARTIN, J. C.,CRUZ-HERNANDEZ, C.,DIONISI, F. & DESTAILLATS, F. 2008. Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. *Lipids*, 43, 887-94.
- THOMPSON, H.,ZHU, Z.,BANNI, S.,DARCY, K.,LOFTUS, T. & IP, C. 1997. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res*, 57, 5067-72.
- THOMPSON, H. J. & SINGH, M. 2000. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5, 409-20.
- THOMPSON, L. U.,SEIDL, M. M.,RICKARD, S. E.,ORCHESON, L. J. & FONG, H. H. 1996. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr Cancer*, 26, 159-65.
- TILLOTSON, J.,DARZYNKIEWICZ, Z.,COHEN, L. & RONAI, Z. 1993. Effects of linoleic-Acid on mammary-tumor cell-proliferation are associated with changes in p53 protein expression. *Int J Oncol*, 3, 81-7.
- TODOROVA, V. K.,HARMS, S. A.,KAUFMANN, Y.,LUO, S.,LUO, K. Q.,BABB, K. & KLIMBERG, V. S. 2004. Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res Treat*, 88, 247-56.
- TOMASSONI, M. L.,AMORI, D. & MAGNI, M. V. 1999. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 258, 476-81.
- TOWNSEND, D. M.,TEW, K. D. & TAPIERO, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57, 145-55.
- TRAVERSO, N.,RICCIARELLI, R.,NITTI, M.,MARENGO, B.,FURFARO, A. L.,PRONZATO, M. A.,MARINARI, U. M. & DOMENICOTTI, C. 2013. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 972913.
- TSAI, S. M.,HOU, M. F.,WU, S. H.,HU, B. W.,YANG, S. F.,CHEN, W. T.,CHAI, C. Y.,MA, H. & TSAI, L. Y. 2011. Expression of manganese superoxide dismutase in patients with breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci*, 27, 167-72.
- TURRENS, J. F.,CRAPO, J. D. & FREEMAN, B. A. 1984. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest*, 73, 87-95.
- UCHIDA, N.,OKAMURA, S.,NAGAMACHI, Y. & YAMASHITA, S. 1997. Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123, 280-5.
- URSINI, F.,HEIM, S.,KIESS, M.,MAIORINO, M.,ROVERI, A.,WISSING, J. & FLOHE, L. 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285, 1393-6.
- VACARESSE, N.,LAJOIE-MAZENC, I.,AUGE, N.,SUC, I.,FRISACH, M. F.,SALVAYRE, R. & NEGRE-SALVAYRE, A. 1999. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ Res*, 85, 892-9.
- VALKO, M.,IZAKOVIC, M.,MAZUR, M.,RHODES, C. J. & TELSER, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266, 37-56.
- VALKO, M.,LEIBFRITZ, D.,MONCOL, J.,CRONIN, M. T.,MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- VALKO, M.,MORRIS, H.,MAZUR, M.,RAPTA, P. & BILTON, R. F. 2001. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta*, 1527, 161-6.
- VALKO, M.,RHODES, C. J.,MONCOL, J.,IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.

- VAN DE VIJVER, M. J. & NUSSE, R. 1991. The molecular biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1072, 33-50.
- VENKATRAMAN, J. T., ANGKEOW, P., SATSANGI, N. & FERNANDES, G. 1998. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. *J Am Coll Nutr*, 17, 586-94.
- VINCENT, H. K., POWERS, S. K., DIRKS, A. J. & SCARPACE, P. J. 2001. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25, 378-88.
- VINOTHINI, G., MANIKANDAN, P., ANANDAN, R. & NAGINI, S. 2009. 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*, 47, 1852-63.
- VISIOLI, F., COLOMBO, C. & GALLI, C. 1998. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers. *Biochem Biophys Res Commun*, 245, 487-9.
- VISIOLI, F. & GALLI, C. 2002. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42, 209-21.
- VISIOLI, F. G., C. 1998. Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *J Agricult. Food Chem.*, 10, 4292-96.
- WAGNER, B. A., BUETTNER, G. R. & BURNS, C. P. 1994. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, 33, 4449-53.
- WAKABAYASHI, Y., NAKADA, T., MURATA, K., OHKURA, S., MOGI, K., NAVARRO, V. M., CLIFTON, D. K., MORI, Y., TSUKAMURA, H., MAEDA, K., STEINER, R. A. & OKAMURA, H. 2010. 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*, 30, 3124-32.
- WALKER, S. A. & LOCKYER, P. J. 2004. Visualizing Ras signalling in real-time. *J Cell Sci*, 117, 2879-86.
- WALLACE, K. B. K., J. E. XU Y. BACHOWSKI, S. JIANG, J. 1997. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. *Free Radical Toxicology* (Wallace K. B. ed.), 375-400.
- WANG, X. J., SUN, Z., VILLENEUVE, N. F., ZHANG, S., ZHAO, F., LI, Y., CHEN, W., YI, X., ZHENG, W., WONDRAK, G. T., WONG, P. K. & ZHANG, D. D. 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29, 1235-43.
- WANG, X. J., YUAN, S. L., LU, Q., LU, Y. R., ZHANG, J., LIU, Y. & WANG, W. D. 2004. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 10, 2478-81.
- WANG, Y., LAM, K. S. & XU, A. 2007. Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res*, 17, 280-2.
- WANG, Y., YANG, J. & YI, J. 2012. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal*, 16, 649-57.
- WANG, Y., YUN, B. W., KWON, E., HONG, J. K., YOON, J. & LOAKE, G. J. 2006. S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J Exp Bot*, 57, 1777-84.
- WATSON, W. H., CAI, J. & JONES, D. P. 2000. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr*, 20, 485-505.
- WCRF/AICR 2007. Food, Nutrition, Physical Activity, and the prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AIRC.
- WEBER, P. C. 1990. N-3 Fatty-Acids and Human-Disease. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 50, 14-19.

- WEIGELT, B.,HORLINGS, H. M.,KREIKE, B.,HAYES, M. M.,HAUPTMANN, M.,WESSELS, L. F.,DE JONG, D.,VAN DE VIJVER, M. J.,VAN'T VEER, L. J. & PETERSE, J. L. 2008. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*, 216, 141-50.
- WEINBRENNER, T.,FITO, M.,FARRE ALBALADEJO, M.,SAEZ, G. T.,RIJKEN, P.,TORMOS, C.,COOLEN, S.,DE LA TORRE, R. & COVAS, M. I. 2004. Bioavailability of phenolic compounds from olive oil and oxidative/antioxidant status at postprandial state in healthy humans. *Drugs Exp Clin Res*, 30, 207-12.
- WEISBURGER, J. H. 1997. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J Am Diet Assoc*, 97, S16-23.
- WEISS, L. G., R.D. 1982. La glándula mamaria. *Histología Ed. El Ateneo*, Barcelona, 822-45.
- WELSCH, C. W. 1987. Enhancement of Mammary Tumorigenesis by Dietary-Fat - Review of Potential Mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45, 192-202.
- WELSCH, C. W. & AYLSWORTH, C. F. 1983. Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding high levels of dietary fat: a hormonal mechanism? *J Natl Cancer Inst*, 70, 215-21.
- WEYDERT, C. J. & CULLEN, J. J. 2010a. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*, 5, 51-66.
- WEYDERT, C. J. & CULLEN, J. J. 2010b. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat. Protocols*, 5, 51-66.
- WEYER, C.,FUNAHASHI, T.,TANAKA, S.,HOTTA, K.,MATSUZAWA, Y.,PRATLEY, R. E. & TATARANNI, P. A. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 1930-5.
- WHITE, E.,SHANNON, J. S. & PATTERSON, R. E. 1997. Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 769-74.
- WHO/IARC 2012. WHO classification of tumours of the breast. 4th edition. Lyon : International Agency for Research on Cancer.
- WIDSCHWENDTER, M. & JONES, P. A. 2002. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 21, 5462-5482.
- WIDSCHWENDTER, M.,SIEGMUND, K. D.,MULLER, H. M.,FIEGL, H.,MARTH, C.,MULLER-HOLZNER, E.,JONES, P. A. & LAIRD, P. W. 2004. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res*, 64, 3807-13.
- WILLETT, W. C. 1998. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. *Semin Cancer Biol*, 8, 245-53.
- WILLETT, W. C. 1999. Dietary fat and breast cancer. *Toxicol Sci*, 52, 127-46.
- WILLETT, W. C. 2001a. Diet and breast cancer. *J Intern Med*, 249, 395-411.
- WILLETT, W. C. 2001b. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 3-8.
- WILLETT, W. C.,SACKS, F.,TRICHOPOULOU, A.,DRESCHER, G.,FERRO-LUZZI, A.,HELSING, E. & TRICHOPOULOS, D. 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*, 61, 1402S-1406S.
- WOGAN, G. N.,HECHT, S. S.,FELTON, J. S.,CONNEY, A. H. & LOEB, L. A. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 14, 473-86.
- WONG, C. M.,CHEEMA, A. K.,ZHANG, L. & SUZUKI, Y. J. 2008. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ Res*, 102, 310-8.

- WONG, S. H., KNIGHT, J. A., HOPFER, S. M., ZAHARIA, O., LEACH, C. N., JR. & SUNDERMAN, F. W., JR. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem*, 33, 214-20.
- WOOSTER, R. & STRATTON, M. R. 1995. Breast-Cancer Susceptibility - a Complex Disease Unravels. *Trends in Genetics*, 11, 3-5.
- WOUTERSEN, R. A., APPEL, M. J., VAN GARDEREN-HOETMER, A. & WIJNANDS, M. V. 1999. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat Res*, 443, 111-27.
- WREN, B. G. 2004. Do female sex hormones initiate breast cancer? A review of the evidence. *Climacteric*, 7, 120-8.
- WU, G., FANG, Y. Z., YANG, S., LUPTON, J. R. & TURNER, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134, 489-92.
- WU, H. H. & MOMAND, J. 1998. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents p53 activation and promotes p53 cysteine residue oxidation. *J Biol Chem*, 273, 18898-905.
- WYNDER, E. L., COHEN, L. A., MUSCAT, J. E., WINTERS, B., DWYER, J. T. & BLACKBURN, G. 1997. Breast cancer: weighing the evidence for a promoting role of dietary fat. *J Natl Cancer Inst*, 89, 766-75.
- XU, C., LI, C. Y. & KONG, A. N. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*, 28, 249-68.
- XUE, W. & WARSHAWSKY, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206, 73-93.
- YAN, L. J., LEVINE, R. L. & SOHAL, R. S. 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11168-72.
- YAN, L. J. & SOHAL, R. S. 1998. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12896-901.
- YANG, L., PANG, Y. L. & MOSES, H. L. 2010. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, 31, 220-227.
- YAO, Y., HONG, S., ZHOU, H., YUAN, T., ZENG, R. & LIAO, K. 2009. The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. *Cell Res*, 19, 497-506.
- YAQOOB, P. 2009. The nutritional significance of lipid rafts. *Annu Rev Nutr*, 29, 257-82.
- YAQOOB, P., KNAPPER, J. A., WEBB, D. H., WILLIAMS, C. M., NEWSHOLME, E. A. & CALDER, P. C. 1998. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr*, 67, 129-35.
- YEH, C. C., HOU, M. F., WU, S. H., TSAI, S. M., LIN, S. K., HOU, L. A., MA, H. & TSAI, L. Y. 2006. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct*, 24, 555-9.
- YEN, C. C. 1993a. Ciclo menstrual humano: regulación neuroendocrina. *Endocrinología de la reproducción*. Editorial Médica Panamericana.
- YEN, S. 1993b. Prolactina en la reproducción humana. *Endocrinología de la reproducción*. Editorial Médica Panamericana, 382-413.
- YOSHIDA, Y., NIKI, E. & NOGUCHI, N. 2003. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem Phys Lipids*, 123, 63-75.
- YOU, W. C., ZHANG, L., GAIL, M. H., CHANG, Y. S., LIU, W. D., MA, J. L., LI, J. Y., JIN, M. L., HU, Y. R., YANG, C. S., BLASER, M. J., CORREA, P., BLOT, W. J., FRAUMENI, J. F., JR. & XU, G. W. 2000. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1607-12.

- YOUNG, A. J. & LOWE, G. M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 385, 20-7.
- YOUNG, O., CROTTY, T., O'CONNELL, R., O'SULLIVAN, J. & CURRAN, A. J. 2010. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head Neck*, 32, 750-6.
- YOUNG, S. & HALLOWES, R. C. 1973. Tumours of the mammary gland. *IARC Sci Publ*, 31-73.
- YUAN, L. 1997. Identification and quantitative analysis of DNA damage products using LC-MS-MS.
- YUVARAJ, S., PREMKUMAR, V. G., VIJAYASARATHY, K., GANGADARAN, S. G. & SACHDANANDAM, P. 2008. Augmented antioxidant status in Tamoxifen treated postmenopausal women with breast cancer on co-administration with Coenzyme Q10, Niacin and Riboflavin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 61, 933-41.
- ZAFIRIOU, M. P., DEVA, R., CICCOLI, R., SIAFAKA-KAPADAI, A. & NIGAM, S. 2007. Biological role of hepoxilins: upregulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as a cellular response to oxidative stress? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77, 209-15.
- ZANGAR, R. C., DAVYDOV, D. R. & VERMA, S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199, 316-31.
- ZHANG, D. D. & HANNINK, M. 2003. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 23, 8137-51.
- ZHANG, L., JIN, Y., HUANG, M. & PENNING, T. M. 2012. The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Front Pharmacol*, 3, 193.
- ZHANG, S. M., COOK, N. R., ALBERT, C. M., GAZIANO, J. M., BURING, J. E. & MANSON, J. E. 2008. Effect of combined folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on cancer risk in women: a randomized trial. *JAMA*, 300, 2012-21.
- ZHUANG, L., LIN, J., LU, M. L., SOLOMON, K. R. & FREEMAN, M. R. 2002. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62, 2227-31.
- ZMIJEWSKI, J. W., LANDAR, A., WATANABE, N., DICKINSON, D. A., NOGUCHI, N. & DARLEY-USMAR, V. M. 2005. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans*, 33, 1385-9.



## ANEXO

Anexo Tabla 1. Correlación entre la expresión y actividad CAT en hígado de animales sanos.

Edad	Grupo	n	C.C	p-valor
52d	Cs	10	-,111	,655
	Ms	10	,111	,655
	Os	10	,111	,655
54d	Cs	5	-,400	,327
	Ms	5	,000	1,000
	Os	5	,000	1,000
55d	Cs	5	-,400	,327
	Ms	5	-,200	,624
	Os	5	-,200	,624
58d	Cs	5	,400	,327
	Ms	5	,800	,050
	Os	5	,200	,624
63d	Cs	5	-,400	,327
	Ms	5	,600	,142
	Os	5	-,200	,624
100d	Cs	5	,200	,624
	Ms	5	,600	,142
	Os	5	,400	,327
150d	Cs	5	,200	,624
	Ms	5	,200	,624
	Os	5	,200	,624

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas. Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

Anexo Tabla 2. Correlación entre la expresión de SOD1 y de SOD2 y la actividad SOD en hígado de animales sanos.

Edad	Grupo	n	SOD1 mRNA		SOD2mRNA		
			C.C.	p- valor	C.C.	p- valor	
52	Cs	10	SOD1 mRNA	---	---	0,47	0,06
			SOD Act.	0,33	0,18	0,24	0,33
	Ms	10	SOD1 mRNA.	---	---	0,24	0,33
			SOD Act.	,689**	0,01	0,29	0,24
	Os	10	SOD1 mRNA.	---	---	0,47	0,06
			SOD Act.	0,33	0,18	0,07	0,79
54	Cs	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,60	0,14
			SOD Act.	-0,40	0,33	-0,40	0,33
	Ms	5	SOD1 mRNA.	---	---	-1,000*	
			SOD Act.	1,000**		-1,000**	
	Os	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			SOD Act.	-0,60	0,14	0,20	0,62
55	Cs	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,00	1,00
			SOD Act.	0,00	1,00	-0,60	0,14
	Ms	5	SOD1 mRNA.	---	---	-0,20	0,62
			SOD Act.	0,60	0,14	-0,20	0,62
	Os	5	SOD1 mRNA.	---	---	-0,20	0,62
			SOD Act.	0,20	0,62	-0,20	0,62
58	Cs	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,80	0,05
			SOD Act.	0,60	0,14	0,80	0,05
	Ms	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,60	0,14
			SOD Act.	-0,40	0,33	-0,80	0,05
	Os	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,00	1,00
			SOD Act.	0,80	0,05	0,20	0,62
63	Cs	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,00	1,00
			SOD Act.	0,20	0,62	0,40	0,33
	Ms	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			SOD Act.	0,60	0,14	0,80	0,05
	Os	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,11	0,80
			SOD Act.	0,20	0,62	-0,11	0,80
100	Cs	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			SOD Act.	0,20	0,62	0,00	1,00
	Ms	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,53	0,21
			SOD Act.	0,20	0,62	0,11	0,80
	Os	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			SOD Act.	0,40	0,33	0,60	0,14
150	Cs	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			SOD Act.	-0,40	0,33	-0,40	0,33
	Ms	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,60	0,14
			SOD Act.	0,40	0,33	0,00	1,00
	Os	5	SOD1 mRNA.	---	---	0,60	0,14
			SOD Act.	-0,80	0,05	-0,40	0,33

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

Anexo Tabla 3. Correlación entre la expresión de GPX1 y de GPX4 y la actividad GPX en hígado de animales sanos

Edad	Grupo	n	GPX1 mRNA.		GPX4 mRNA		
			C.C.	p- valor	C.C.	p- valor	
52d	Cs	10	GPX1 mRNA.	---	---	0,33	0,18
			GPX Act.	0,42	0,09	0,02	0,93
	Ms	10	GPX1 mRNA.	---	---	0,29	0,24
			GPX Act.	-0,07	0,79	0,02	0,93
	Os	10	GPX1 mRNA.	---	---	-0,33	0,18
			GPX Act.	0,33	0,18	-0,02	0,93
54	Cs	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			GPX Act.	0,60	0,14	-0,20	0,62
	Ms	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			GPX Act.	0,00	1,00	-0,40	0,33
	Os	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,80	0,05
			GPX Act.	0,60	0,14	0,40	0,33
55	Cs	5	GPX1 mRNA.	---	---	1,000*	
			GPX Act.	0,20	0,62	0,20	0,62
	Ms	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			GPX Act.	0,00	1,00	0,60	0,14
	Os	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,80	0,05
			GPX Act.	,949*	0,02	0,74	0,08
58	Cs	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,60	0,14
			GPX Act.	0,00	1,00	0,00	1,00
	Ms	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			GPX Act.	0,00	1,00	0,40	0,33
	Os	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,80	0,05
			GPX Act.	0,20	0,62	0,00	1,00
63	Cs	5	GPX1 mRNA.	---	---	-0,60	0,14
			GPX Act.	0,60	0,14	-1,000**	
	Ms	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			GPX Act.	0,00	1,00	-0,60	0,14
	Os	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,60	0,14
			GPX Act.	0,00	1,00	0,00	1,00
100	Cs	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			GPX Act.	0,20	0,62	-0,60	0,14
	Ms	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			GPX Act.	0,20	0,62	-0,20	0,62
	Os	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,20	0,62
			GPX Act.	0,40	0,33	0,00	1,00
150	Cs	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			GPX Act.	0,00	1,00	-0,20	0,62
	Ms	5	GPX1 mRNA.	---	---	0,40	0,33
			GPX Act.	0,00	1,00	0,60	0,14
	Os	5	GPX1 mRNA.	---	---	-0,11	0,80
			GPX Act.	0,20	0,62	0,32	0,45

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

**Anexo Tabla 4. Correlaciones entre los niveles de NRF2 total y NRF2 unido a KEAP1 y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR en hígado de animales sanos.**

Edad	Grupo		NRF2 Total		GPX1 mRNA		GPX4 mRNA		GR mRNA	
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor
52	Cs	NRF2 Total	---	---	-,200	,421	-,067	,788	,067	,788
		NRF2-KEAP1	-,022	,929	,111	,655	,244	,325	,111	,655
	Ms	NRF2 Total	---	---	,422	,089	-,022	,929	,244	,325
		NRF2-KEAP1	,111	,655	,244	,325	,511*	,040	,422	,089
	Os	NRF2 Total	---	---	-,022	,929	-,289	,245	,022	,929
		NRF2-KEAP1	-,222	,404	-,278	,297	,222	,404	-,222	,404
54	Cs	NRF2 Total	---	---	,400	,327	,000	1,000	-,200	,624
		NRF2-KEAP1	-,600	,142	,000	1,000	,400	,327	,600	,142
	Ms	NRF2 Total	---	---	,200	,624	-,200	,624	,000	,624
		NRF2-KEAP1	,000	1,000	-,400	,327	-,0,8	,050	-,600	,142
	Os	NRF2 Total	---	---	-,400	,327	-,200	,624	-,400	,327
		NRF2-KEAP1	-,200	,624	,400	,327	,200	,624	,800	,050
55	Cs	NRF2 Total	---	---	-,600	,142	-,600	,142	,400	,327
		NRF2-KEAP1	,400	,327	-,800	,050	-,800	,050	-,200	,624
	Ms	NRF2 Total	---	---	,600	,142	,800	,050	,800	,050
		NRF2-KEAP1	-,400	,327	-,400	,327	-,0,2	,624	-,200	,624
	Os	NRF2 Total	---	---	,800	,050	,600	,142	,200	,624
		NRF2-KEAP1	-,400	,327	-,200	,624	-,400	,327	-,400	,327
58	Cs	NRF2 Total	---	---	-,600	,142	-,200	,624	,000	1,000
	Ms	NRF2 Total	---	---	-,400	,327	,400	,327	,527	,207
	Os	NRF2 Total	---	---	-,400	,327	-,600	,142	-,200	,624
63	Cs	NRF2 Total	---	---	,200	,624	0,2	,624	,600	,142
	Ms	NRF2 Total	---	---	,000	1,000	-,200	,624	,400	,327
	Os	NRF2 Total	---	---	,400	,327	,400	,327	,600	,142
100	Cs	NRF2 Total	---	---	,600	,142	-,200	,624	,000	1,000
		NRF2-KEAP1	,000	1,000	,400	,327	,400	,327	-,600	,142
	Ms	NRF2 Total	---	---	,000	1,000	-,800	,050	-,600	,142
		NRF2-KEAP1	-,200	,624	,800	,050	0	1,000	,600	,142
	Os	NRF2 Total	---	---	,200	,624	-,200	,624	,600	,142
		NRF2-KEAP1	,000	1,000	,400	,327	,000	1,000	,400	,327
150	Cs	NRF2 Total	---	---	-,200	,624	0,4	,327	0	1
	Ms	NRF2 Total	---	---	-,400	,327	,200	,624	,200	,624
	Os	NRF2 Total	---	---	-,200	,624	,316	,448	,000	1,000

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul). Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

Anexo Tabla 5. Correlación de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes entre hígado y glándula mamaria de animales sanos

Edad	Grupo	n		CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR
52	Cs	10	C.C	-,200	,225	,022	,156	-,022	,378
			p-valor	,421	,369	,929	,531	,929	,128
	Ms	10	C.C	-,022	,467	-,467	-,022	,067	,405
			p-valor	,929	,060	,060	,929	,788	,106
	Os	10	C.C	,111	,467	,022	,289	,200	-,045
			p-valor	,655	,060	,929	,245	,421	,857
54	Cs	5	C.C	-,400	,400	,400	-,400	-,316	,000
			p-valor	,327	,327	,327	,327	,448	1,000
	Ms	5	C.C	,600	-,400	,400	-,200	-,400	-,800
			p-valor	,142	,327	,327	,624	,327	,050
	Os	5	C.C	,800	-,200	,200	,400	-,800	,000
			p-valor	,050	,624	,624	,327	,050	1,000
55	Cs	5	C.C	,400	,400	,000	,400	-,400	,105
			p-valor	,327	,327	1,000	,327	,327	,801
	Ms	5	C.C	-,200	-,200	,600	-,200	,200	,000
			p-valor	,624	,624	,142	,624	,624	1,000
	Os	5	C.C	-,400	,200	,800	,400	-,200	,200
			p-valor	,327	,624	,050	,327	,624	,624
58	Cs	5	C.C	-,600	,400	,000	,000	,400	,600
			p-valor	,142	,327	1,000	1,000	,327	,142
	Ms	5	C.C	-,600	-,400	,600	-,200	,000	-,444
			p-valor	,142	,327	,142	,624	1,000	,298
	Os	5	C.C	-,600	,000	-,200	,000	,600	,600
			p-valor	,142	1,000	,624	1,000	,142	,142
63	Cs	5	C.C	,200	-,400	,800	-,600	-,400	-,400
			p-valor	,624	,327	,050	,142	,327	,327
	Ms	5	C.C	-,200	,800	,800	-,200	,200	-,200
			p-valor	,624	,050	,050	,624	,624	,624
	Os	5	C.C	-,800	-,400	,316	,400	,200	,200
			p-valor	,050	,327	,448	,327	,624	,624
100	Cs	5	C.C	,000	-,200	,527	,000	,000	,600
			p-valor	1,000	,624	,207	1,000	1,000	,142
	Ms	5	C.C	,600	-,400	,105	,200	,200	,400
			p-valor	,142	,327	,801	,624	,624	,327
	Os	5	C.C	,000	,200	,000	,800	-,200	<b>1,000**</b>
			p-valor	1,000	,624	1,000	,050	,624	
150	Cs	5	C.C	<b>-1,000**</b>	-,200	-,400	-,400	-,800	-,800
			p-valor		,624	,327	,327	,050	,050
	Ms	5	C.C	-,200	,738	-,400	,200	-,800	-,600
			p-valor	,624	,077	,327	,624	,050	,142
	Os	5	C.C	,600	,000	,600	-,200	,105	,527
			p-valor	,142	1,000	,142	,624	,801	,207

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; \*\*: p<0.001 (en rojo). Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

Anexo Tabla 6. Correlación entre los parámetros de glutatión en plasma de animales sanos.

Edad	Grupo	n	GSH		GSH total		GSSG		GSH/GSSG		
			C.C	p-valor	C.C	p-valor	C.C	p-valor	C.C	p-valor	
	Cs	10	GSH	---	---	.822**	.001	.644**	.009	-.556*	.025
			GSH total	.822**	.001	---	---	.822**	.001	-.733**	.003
			GSSG	.644**	.009	.822**	.001	---	---	-.911**	.000
52	Ms	10	GSH	---	---	.867**	.000	.600*	.016	-.511*	.040
			GSH total	.867**	.000	---	---	.733**	.003	-.644**	.009
			GSSG	.600*	.016	.733**	.003	---	---	-.911**	.000
	Os	10	GSH	---	---	.899**	.000	.629*	.012	-.614*	.015
			GSH total	.899**	.000	---	---	.733**	.003	-.719**	.004
			GSSG	.629*	.012	.733**	.003	---	---	-.989**	.000
54	Cs	5	GSH	---	---	0,8	.050	0	1,000	0	1,000
			GSH total	0,8	.050	---	---	0,2	.624	-0,2	.624
			GSSG	0	1,000	0,2	.624	---	---	-1,000*	
	Ms	5	GSH	---	---	0,8	.050	0,4	.327	-0,2	.624
			GSH total	0,8	.050	---	---	0,6	.142	-0,4	.327
			GSSG	0,4	.327	0,6	.142	---	---	-0,8	.050
	Os	5	GSH	---	---	1,000*		0,8	.050	-0,6	.142
			GSH total	1,000**		---	---	0,8	.050	-0,6	.142
			GSSG	0,8	.050	0,8	.050	---	---	-0,8	.050
55	Cs	5	GSH	---	---	0,8	.050	-0,8	.050	0,8	.050
			GSH total	0,8	.050	---	---	-0,6	.142	0,6	.142
			GSSG	-0,8	.050	-0,6	.142	---	---	-1,000*	
	Ms	5	GSH	---	---	0	1,000	-0,8	.050	1,000*	
			GSH total	0	1,000	---	---	0,2	.624	0	1,000
			GSSG	-0,8	.050	0,2	.624	---	---	-0,8	.050
	Os	5	GSH	---	---	0,4	.327	-0,2	.624	0,4	.327
			GSH total	0,4	.327	---	---	0,4	.327	-0,2	.624
			GSSG	-0,2	.624	0,4	.327	---	---	-0,8	.050
58	Cs	5	GSH	---	---	1,000*		1,000*		-1,000*	
			GSH total	1,000**		---	---	1,000*		-1,000*	
			GSSG	1,000**		1,000**		---	---	-1,000*	
	Ms	5	GSH	---	---	1,000*		0,8	.050	-0,6	.142
			GSH total	1,000**		---	---	0,8	.050	-0,6	.142
			GSSG	0,8	.050	0,8	.050	---	---	-0,8	.050
	Os	5	GSH	---	---	1,000*		0,8	.050	-0,8	.050
			GSH total	1,000**		---	---	0,8	.050	-0,8	.050
			GSSG	0,8	.050	0,8	.050	---	---	-1,000*	
63	Cs	5	GSH	---	---	0	1,000	-0,2	.624	0,2	.624
			GSH total	0	1,000	---	---	0,8	.050	-0,8	.050
			GSSG	-0,2	.624	0,8	.050	---	---	-1,000*	
	Ms	5	GSH	---	---	0,2	.624	-0,2	.624	0,2	.624
			GSH total	0,2	.624	---	---	0,6	.142	-0,6	.142
			GSSG	-0,2	.624	0,6	.142	---	---	-1,000*	
	Os	5	GSH	---	---	0,8	.050	0	1,000	0,2	.624
			GSH total	0,8	.050	---	---	0,2	.624	0	1,000
			GSSG	0	1,000	0,2	.624	---	---	-0,8	.050
100	Cs	5	GSH	---	---	0	1,000	-0,2	.624	0,2	.624
			GSH total	0	1,000	---	---	0,8	.050	-0,8	.050
			GSSG	-0,2	.624	0,8	.050	---	---	-1,000*	
	Ms	5	GSH	---	---	0,8	.050	0,8	.050	0,4	.327
			GSH total	0,8	.050	---	---	1,000*		0,2	.624
			GSSG	0,8	.050	1,000**		---	---	0,2	.624
	Os	5	GSH	---	---	-0,2	.624	-0,2	.624	0,2	.624
			GSH total	-0,2	.624	---	---	1,000*		-1,000*	
			GSSG	-0,2	.624	1,000**		---	---	-1,000*	
150	Cs	5	GSH	---	---	0,4	.327	0,4	.327	-0,4	.327
			GSH total	0,4	.327	---	---	1,000*		-1,000*	
			GSSG	0,4	.327	1,000**		---	---	-1,000*	
	Ms	5	GSH	---	---	0,2	.624	-0,4	.327	0,6	.142
			GSH total	0,2	.624	---	---	0,4	.327	-0,2	.624
			GSSG	-0,4	.327	0,4	.327	---	---	-0,8	.050
	Os	5	GSH	---	---	1,000*		0,8	.050	-0,8	.050
			GSH total	1,000**		---	---	0,8	.050	-0,8	.050
			GSSG	0,8	.050	0,8	.050	---	---	-1,000*	

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

Anexo Tabla 7. Correlación entre la actividad hepática de GPX y los niveles plasmáticos de GSH y de GSSG en animales sanos

Edad	Grupo	n		GSH		GSSG	
				C.C.	p-valor	C.C.	p-valor
52	Cs	10	GPX Act.	,200	,421	,022	,929
	Ms	10	GPX Act.	,111	,655	-,022	,929
	Os	10	GPX Act.	-,584*	,020	-,422	,089
54	Cs	5	GPX Act.	-,200	,624	,400	,327
	Ms	5	GPX Act.	-,200	,624	,000	1,000
	Os	5	GPX Act.	-,400	,327	-,200	,624
55	Cs	5	GPX Act.	,000	1,000	-,200	,624
	Ms	5	GPX Act.	,600	,142	-,400	,327
	Os	5	GPX Act.	,527	,207	-,316	,448
58	Cs	5	GPX Act.	-,600	,142	-,600	,142
	Ms	5	GPX Act.	,200	,624	,000	1,000
	Os	5	GPX Act.	-,200	,624	,000	1,000
63	Cs	5	GPX Act.	,000	1,000	,800	,050
	Ms	5	GPX Act.	,200	,624	,200	,624
	Os	5	GPX Act.	,000	1,000	,600	,142
100	Cs	5	GPX Act.	-,600	,142	,200	,624
	Ms	5	GPX Act.	-,200	,624	,000	1,000
	Os	5	GPX Act.	,400	,327	,000	1,000
150	Cs	5	GPX Act.	,200	,624	,000	1,000
	Ms	5	GPX Act.	,000	1,000	-,600	,142
	Os	5	GPX Act.	,000	1,000	,200	,624

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul); GPX Act: actividad GPX. Cs: grupo de dieta control sano; Ms: grupo de aceite de maíz sano; Os: grupo de aceite de oliva sano.

**Anexo Tabla 8. Correlación entre la expresión y actividad CAT hepática tras la administración del carcinógeno.**

<b>Tiempo post-inducción (horas)</b>	<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>C.C.</b>	<b>p-valor</b>
<b>B</b>	<b>Ci</b>	10	-,111	,655
	<b>Mi</b>	10	,111	,655
	<b>Oi</b>	10	,111	,655
<b>12</b>	<b>Ci</b>	10	,200	,421
	<b>Mi</b>	10	-,378	,128
	<b>Oi</b>	10	-,022	,929
<b>24</b>	<b>Ci</b>	10	,200	,421
	<b>Mi</b>	10	,067	,788
	<b>Oi</b>	10	,067	,788
<b>48</b>	<b>Ci</b>	10	-,200	,421
	<b>Mi</b>	10	,111	,655
	<b>Oi</b>	10	-,067	,788

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 9. Correlación entre la expresión de SOD1 y de SOD2 y la actividad SOD en hígado tras la administración del carcinógeno.

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	SOD1 mRNA		SOD2 mRNA		
				p-valor	C.C.	p-valor	
B	Ci	10	SOD1 mRNA	---	---	0,47	0,06
			SOD Act.	0,33	0,18	0,24	0,33
	Mi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,24	0,33
			SOD Act.	,689**	0,01	0,29	0,24
	Oi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,47	0,06
			SOD Act.	0,33	0,18	0,07	0,79
12	Ci	10	SOD1 mRNA	---	---	,644**	0,01
			SOD Act.	-0,16	0,53	-0,07	0,79
	Mi	10	SOD1 mRNA	---	---	,644**	0,01
			SOD Act.	0,00	1,00	0,00	1,00
	Oi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,07	0,79
			SOD Act.	0,07	0,79	-0,16	0,53
24	Ci	10	SOD1 mRNA	---	---	0,40	0,11
			SOD Act.	0,02	0,93	-0,04	0,86
	Mi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,43	0,09
			SOD Act.	-0,11	0,65	-0,20	0,42
	Oi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,40	0,11
			SOD Act.	0,16	0,53	-0,36	0,15
48	Ci	10	SOD1 mRNA	---	---	,523*	0,04
			SOD Act.	-0,02	0,93	0,20	0,42
	Mi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,07	0,79
			SOD Act.	0,02	0,93	-,644**	0,01
	Oi	10	SOD1 mRNA	---	---	0,45	0,07
			SOD Act.	-0,07	0,79	-0,31	0,21

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 10. Correlación entre la expresión de GPX1 y de GPX4 y la actividad GPX en hígado tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	GPX1 mRNA		GPX4 mRNA		
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	
B	Ci	10	GPX1 mRNA	---	---	0,33	0,18
			GPX Act.	0,42	0,09	0,02	0,93
	Mi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,29	0,24
			GPX Act.	-0,07	0,79	0,02	0,93
	Oi	10	GPX1 mRNA	---	---	-0,33	0,18
			GPX Act.	0,33	0,18	-0,02	0,93
12	Ci	10	GPX1 mRNA	---	---	0,47	0,06
			GPX Act.	0,11	0,65	0,02	0,93
	Mi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,47	0,06
			GPX Act.	0,24	0,33	0,16	0,53
	Oi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,11	0,65
			GPX Act.	0,07	0,79	-0,29	0,24
24	Ci	10	GPX1 mRNA	---	---	0,07	0,79
			GPX Act.	0,42	0,09	0,02	0,93
	Mi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,16	0,53
			GPX Act.	,556*	0,03	0,07	0,79
	Oi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,29	0,24
			GPX Act.	,556*	0,03	0,29	0,24
48	Ci	10	GPX1 mRNA	---	---	0,42	0,09
			GPX Act.	0,42	0,09	-0,16	0,53
	Mi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,33	0,18
			GPX Act.	0,42	0,09	-0,07	0,79
	Oi	10	GPX1 mRNA	---	---	0,38	0,13
			GPX Act.	,511*	0,04	-0,11	0,65

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 11. Correlación entre los niveles de NRF total y NRF2 unido a KEAP1 y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR en hígado tras la administración del carcinógeno.

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	NRF2 Total		GPX1 mRNA		GPX4 mRNA		GR mRNA	
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor
B	Ci	10	NRF2 Total	---	-200	,421	-0,67	,788	,067	,788
			NRF2-KEAP1	-,022	,929	,111	,655	,244	,325	,111
	Mi	10	NRF2 Total	---	,422	,089	-,022	,929	,244	,325
			NRF2-KEAP1	,111	,655	,244	,325	,511*	,040	,422
	Oi	10	NRF2 Total	---	-,022	,929	-,289	,245	,022	,929
			NRF2-KEAP1	-,222	,404	-,278	,297	,222	,404	-,222
12	Ci	10	NRF2 Total	---	-,556*	,025	-,200	,421	,244	,325
			NRF2-KEAP1	-,511*	,040	,333	,180	-,200	,421	-,556*
	Mi	10	NRF2 Total	---	,067	,788	-,289	,245	-,296	,241
			NRF2-KEAP1	,200	,421	,333	,180	,244	,325	,205
	Oi	10	NRF2 Total	---	,378	,128	,378	,128	,584*	,020
			NRF2-KEAP1	-,111	,655	-,289	,245	-,200	,421	,090
24	Ci	10	NRF2 Total	---	-,733**	,003	,156	,531	-,022	,929
			NRF2-KEAP1	-,333	,180	-,422	,089	,156	,531	-,200
	Mi	10	NRF2 Total	---	-,156	,531	,067	,788	,022	,929
			NRF2-KEAP1	-,378	,128	-,022	,929	-0,16	,531	-,556*
	Oi	10	NRF2 Total	---	-,111	,655	-,467	,060	,244	,325
			NRF2-KEAP1	,067	,788	-,244	,325	,022	,929	,467
48	Ci	10	NRF2 Total	---	,289	,245	,244	,325	-,422	,089
			NRF2-KEAP1	,289	,245	,467	,060	,511*	,040	-,333
	Mi	10	NRF2 Total	---	,289	,245	,067	,788	-,022	,929
			NRF2-KEAP1	,333	,180	,422	,089	,111	,655	,200
	Oi	10	NRF2 Total	---	,156	,531	-,289	,245	-,184	,468
			NRF2-KEAP1	-,511*	,040	-,067	,788	-,156	,531	-,046

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días); \*: p<0,05 (en azul); \*\*: p<0,001 (en rojo); Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de matz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 12. Correlación de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes entre hígado y glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n		CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR
B	Ci	10	C.C	-,200	,225	,022	,156	-,022	,378
			p-valor	,421	,369	,929	,531	,929	,128
	Mi	10	C.C	-,022	,467	-,467	-,022	,067	,405
			p-valor	,929	,060	,060	,929	,788	,106
	Oi	10	C.C	,111	,467	,022	,289	,200	-,045
			p-valor	,655	,060	,929	,245	,421	,857
12	Ci	10	C.C	-,111	,156	,045	-,022	-,289	,045
			p-valor	,655	,531	,857	,929	,245	,857
	Mi	10	C.C	-,022	,467	-,422	,022	-,067	,068
			p-valor	,929	,060	,089	,929	,788	,787
	Oi	10	C.C	-,111	-,289	-,360	-,067	-,067	,068
			p-valor	,655	,245	,151	,788	,788	,787
24	Ci	10	C.C	,467	-,067	-,090	-,511*	-,644**	,289
			p-valor	,060	,788	,719	,040	,009	,245
	Mi	10	C.C	-,584*	,511*	-,023	,467	-,022	,090
			p-valor	,020	,040	,928	,060	,929	,719
	Oi	10	C.C	,156	,135	-,090	1,000	-,022	,135
			p-valor	,531	,590	,719	,421	,929	,590
48	Ci	10	C.C	-,511*	-,644**	-,322	,244	-,467	-,022
			p-valor	,040	,009	,205	,325	,060	,929
	Mi	10	C.C	,333	,045	-,022	-,111	-,067	,022
			p-valor	,180	,857	,929	,655	,788	,929
	Oi	10	C.C	-,289	,200	-,114	,200	-,022	-,322
			p-valor	,245	,421	,652	,421	,929	,204

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 13. Correlación entre la expresión de SOD1 y SOD2 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	C.C.	p-valor
B	Ci	10	,449	,072
	Mi	10	,378	,128
	Oi	10	,556*	,025
12	Ci	10	,270	,281
	Mi	10	-,422	,089
	Oi	10	,405	,106
24	Ci	10	,156	,531
	Mi	10	-,289	,245
	Oi	10	,270	,281
48	Ci	10	-,045	,857
	Mi	10	,180	,472
	Oi	10	,090	,719

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 14. Correlación entre la expresión de GPX1 y GPX4 en glándula mamaria tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	C.C.	p-valor
B	Ci	10	,333	,180
	Mi	10	,022	,929
	Oi	10	,822**	,001
12	Ci	10	,289	,245
	Mi	10	-,156	,531
	Oi	10	-,244	,325
24	Ci	10	,111	,655
	Mi	10	,467	,060
	Oi	10	,289	,245
48	Ci	10	,511*	,040
	Mi	10	,200	,421
	Oi	10	,689**	,006

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 15. Correlación entre los parámetros de glutatión en plasma tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	GSH		GSH total		GSSG		GSH_GSSG		
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	
B	Ci	10	GSH	---	---	,822**	,001	,644**	,009	-,556 <sup>†</sup>	,025
			GSH total	,822**	,001	---	---	,822**	,001	-,733**	,003
			GSSG	,644**	,009	,822**	,001	---	---	-,911**	,000
	Mi	10	GSH	---	---	,867**	,000	,600*	,016	-,511 <sup>†</sup>	,040
			GSH total	,867**	,000	---	---	,733**	,003	-,644**	,009
			GSSG	,600 <sup>†</sup>	,016	,733**	,003	---	---	-,911**	,000
	Oi	10	GSH	---	---	,899**	,000	,629*	,012	-,614 <sup>†</sup>	,015
			GSH total	,899**	,000	---	---	,733**	,003	-,719**	,004
			GSSG	,629 <sup>†</sup>	,012	,733**	,003	---	---	-,989**	,000
12	Ci	10	GSH	---	---	,467	,060	-,511 <sup>†</sup>	,040	,644**	,009
			GSH total	,467	,060	---	---	,022	,929	,111	,655
			GSSG	-,511 <sup>†</sup>	,040	,022	,929	---	---	-,867**	,000
	Mi	10	GSH	---	---	,289	,245	-,467	,060	,899**	,000
			GSH total	,289	,245	---	---	,244	,325	,180	,472
			GSSG	-,467	,060	,244	,325	---	---	-,584 <sup>†</sup>	,020
	Oi	10	GSH	---	---	,422	,089	,022	,929	,156	,531
			GSH total	,422	,089	---	---	,600*	,016	-,422	,089
			GSSG	,022	,929	,600*	,016	---	---	-,822**	,001
24	Ci	10	GSH	---	---	,911**	,000	-,111	,655	,378	,128
			GSH total	,911**	,000	---	---	-,022	,929	,289	,245
			GSSG	-,111	,655	-,022	,929	---	---	-,733**	,003
	Mi	10	GSH	---	---	,422	,089	-,494 <sup>†</sup>	,048	,600*	,016
			GSH total	,422	,089	---	---	,090	,719	,022	,929
			GSSG	-,494 <sup>†</sup>	,048	,090	,719	---	---	-,899**	,000
	Oi	10	GSH	---	---	,899**	,000	,689**	,006	-,270	,281
			GSH total	,899**	,000	---	---	,809**	,001	-,386	,125
			GSSG	,689**	,006	,809**	,001	---	---	-,584 <sup>†</sup>	,020
48	Ci	10	GSH	---	---	,689**	,006	,467	,060	-,467	,060
			GSH total	,689**	,006	---	---	,778**	,002	-,778**	,002
			GSSG	,467	,060	,778**	,002	---	---	-,1000**	
	Mi	10	GSH	---	---	,689**	,006	,244	,325	,090	,719
			GSH total	,689**	,006	---	---	,556 <sup>†</sup>	,025	-,225	,369
			GSSG	,244	,325	,556 <sup>†</sup>	,025	---	---	-,674**	,007
	Oi	10	GSH	---	---	,867**	,000	,556 <sup>†</sup>	,025	-,156	,531
			GSH total	,867**	,000	---	---	,689**	,006	-,289	,245
			GSSG	,556 <sup>†</sup>	,025	,689**	,006	---	---	-,600 <sup>†</sup>	,016

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 16. Correlación entre la actividad hepática de GPX y los niveles plasmáticos de GSH y GSSG tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	GPX Act.	GSH		GSSG	
				C.C.	p-valor	C.C.	p-valor
B	Ci	10	GPX Act.	,200	,421	,022	,929
	Mi	10	GPX Act.	,111	,655	-,022	,929
	Oi	10	GPX Act.	-,584*	,020	-,422	,089
12	Ci	10	GPX Act.	,067	,788	-,022	,929
	Mi	10	GPX Act.	-,111	,655	,111	,655
	Oi	10	GPX Act.	-,333	,180	,022	,929
24	Ci	10	GPX Act.	,111	,655	-,911**	,000
	Mi	10	GPX Act.	,511*	,040	-,539*	,031
	Oi	10	GPX Act.	,022	,929	-,022	,929
48	Ci	10	GPX Act.	-,156	,531	-,244	,325
	Mi	10	GPX Act.	,156	,531	,022	,929
	Oi	10	GPX Act.	-,067	,788	,200	,421

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). GPX Act: Actividad GPX. Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 17. Correlación entre los niveles relativos de expresión de GSS y los niveles de GSH total tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	C.C.	p-valor
B	Ci	10	,156	,531
	Mi	10	-,022	,929
	Oi	10	,244	,325
24	Ci	10	-,333	,180
	Mi	10	,289	,245
	Oi	10	-,315	,209
48	Ci	10	,111	,655
	Mi	10	,360	,151
	Oi	10	-,067	,788

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 18. Correlación entre os niveles de actividad de GR y los niveles de GSH tras la administración del carcinógeno.**

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	C.C.	p-valor
B	Ci	10	-,156	,531
	Mi	10	-,378	,128
	Oi	10	-,135	,590
48	Ci	10	-,200	,421
	Mi	10	,333	,180
	Oi	10	,022	,929

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 19. Correlación entre los niveles de MDA y 8-OHdG y Proteínas oxidadas tras la inducción con el carcinógeno.

Tiempo post-inducción	Grupo	n	MDA		8-OHdG		Prot. ox.		
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	
B	Ci	10	<b>8-OHdG</b>	,333	,180	---	---	-,289	,245
		5	<b>MDA</b>	---	---	,333	,180	,022	,929
	Mi	10	<b>8-OHdG</b>	,045	,857	---	---	,467	,060
		5	<b>MDA</b>	---	---	,045	,857	-,045	,857
	Oi	10	<b>8-OHdG</b>	,067	,788	---	---	,244	,325
		5	<b>MDA</b>	---	---	,067	,788	-,067	,788
12	Ci	10	<b>8-OHdG</b>	,600	,142	---	---	-,200	,624
		5	<b>MDA</b>	---	---	,600	,142	-,600	,142
	Mi	10	<b>8-OHdG</b>	,600	,142	---	---	,800	,050
		5	<b>MDA</b>	---	---	,600	,142	,800	,050
	Oi	10	<b>8-OHdG</b>	,200	,624	---	---	,600	,142
		5	<b>MDA</b>	---	---	,200	,624	,600	,142
24	Ci	10	<b>8-OHdG</b>	0,000	1,000	---	---		
	Mi	10	<b>8-OHdG</b>	,400	,327	---	---		
	Oi	10	<b>8-OHdG</b>	,200	,624	---	---		
48	Ci	10	<b>8-OHdG</b>	-,400	,327	---	---		
	Mi	10	<b>8-OHdG</b>	-,400	,327	---	---		
	Oi	10	<b>8-OHdG</b>	0,000	1,000	---	---		

n: número de efectivos (para las proteínas oxidadas n=5); C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; Prot. ox: proteínas oxidadas. p-valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 20. Correlación entre los niveles de expresión de PARP y OGG y los niveles de 8-OHdG tras la administración del carcinógeno.

Tiempo post-inducción (horas)	Grupo	n	PARP mRNA		8-OHdG		
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	
B	Ci	10	OGG mRNA	,303	,236	,629*	,014
			PARP mRNA	---	---	,111	,655
	Mi	10	OGG mRNA	,736**	,004	-,184	,469
			PARP mRNA	---	---	-,244	,325
	Oi	10	OGG mRNA	,705**	,005	,023	,928
			PARP mRNA	---	---	,244	,325
12	Ci	10	OGG mRNA	-,114	,652	-,386	,125
			PARP mRNA	---	---	,378	,128
	Mi	10	OGG mRNA	,405	,106	,378	,128
			PARP mRNA	---	---	,539*	,031
	Oi	10	OGG mRNA	,733**	,003	,111	,655
			PARP mRNA	---	---	,200	,421
24	Ci	10	OGG mRNA	,814**	,000	-,322	,205
			PARP mRNA	---	---	-,135	,590
	Mi	10	OGG mRNA	,539*	,031	,405	,106
			PARP mRNA	---	---	,467	,060
	Oi	10	OGG mRNA	,659**	,009	-,068	,787
			PARP mRNA	---	---	,156	,531
48	Ci	10	OGG mRNA	,477	,058	,023	,928
			PARP mRNA	---	---	-,156	,531
	Mi	10	OGG mRNA	,296	,241	,386	,125
			PARP mRNA	---	---	-,200	,421
	Oi	10	OGG mRNA	,966**	,000	,138	,587
			PARP mRNA	---	---	,156	,531

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall; p valor: nivel de significación para dos colas; B: Niveles basales (52 días). \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 21. Correlación entre la expresión y actividad CAT en hígado de animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n	C.C.	p-valor
100	Ci	10	,244	,325
	Mi	10	,111	,655
	Oi	9	,422	,089
150	Ci	10	,022	,929
	Mi	10	,467	,060
	Oi	9	,111	,677

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas; Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 22. Correlación entre la expresión de SOD1 y SOD2 y la actividad SOD en hígado de animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n		SOD1 mRNA		SOD2 mRNA	
				C.C.	p-valor	C.C.	p-valor
100	Ci	10	SOD1 mRNA	---	---	,156	,531
			SOD Act.	,156	,531	-,156	,531
	Mi	10	SOD1 mRNA	---	---	,067	,788
			SOD Act.	-,289	,245	-,333	,180
	Oi	10	SOD1 mRNA	---	---	,333	,180
			SOD Act.	,584*	,020	,674**	,007
150	Ci	10	SOD1 mRNA	---	---	,556*	,025
			SOD Act.	-,111	,655	,067	,788
	Mi	10	SOD1 mRNA	---	---	,674**	,007
			SOD Act.	,289	,245	,135	,590
	Oi	9	SOD1 mRNA	---	---	,444	,095
			SOD Act.	,333	,211	-,111	,677

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul); \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 23. Correlación entre la expresión de GPX1 t GPX4 y la actividad GPX en hígado de animales adultos previamente inducidos.

Edad	Grupo	n		GPX1 mRNA		GPX4 mRNA	
				C.C.	p- valor	C.C.	p- valor
100	Ci	10	GPX1 mRNA	---	---	,022	,929
			GPX Act.	-,111	,655	,067	,788
	Mi	10	GPX1 mRNA	---	---	,467	,060
			GPX Act.	,022	,929	-,333	,180
	Oi	10	GPX1 mRNA	---	---	,378	,128
			GPX Act.	-,111	,655	-,111	,655
150	Ci	10	GPX1 mRNA	---	---	,467	,060
			GPX Act.	,360	,151	-,045	,857
	Mi	10	GPX1 mRNA	---	---	,111	,655
			GPX Act.	,778**	,002	-,111	,655
	Oi	9	GPX1 mRNA	---	---	,222	,404
			GPX Act.	,778**	,004	,111	,677

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas; \*\*: p<0.001 (en rojo). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 24. Correlación entre los niveles de NRF2 total y NRF2 unido a KEAP1 y las expresiones de GPX1, GPX4 y GR en hígado de animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n	NRF2 total		GPX1 mRNA		GPX4 mRNA		GR mRNA		
			C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	
100	Ci	10	NRF2 total	---	---	,022	,929	,111	,655	-,156	,531
			NRF2-KEAP1	,378	,128	-,156	,531	-,156	,531	,022	,929
	Mi	10	NRF2 total	---	---	,378	,128	,200	,421	,289	,245
			NRF2-KEAP1	-,200	,421	-,467	,060	-,378	,128	-,467	,060
	Oi	10	NRF2 total	---	---	-,111	,655	,067	,788	,090	,719
			NRF2-KEAP1	,022	,929	-,022	,929	-,022		-,135	,590
150	Ci	10	NRF2 total	---	---	,467	,060	,200	,421	,135	,590
	Mi	10	NRF2 total	---	---	,156	,531	,156	,531	,111	,655
	Oi	9	NRF2 total	---	---	,056	,835	-,056	,835	-,056	,835

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas; Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 25. Correlación de la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes entre hígado y glándula mamaria de animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n		CAT	SOD1	SOD2	GPX1	GPX4	GR
100	Ci	10	C.C.	,244	-,067	,422	-,022	0,000	,111
			p-valor	,325	,788	,089	,929	1,000	,655
	Mi	10	C.C.	,200	-,111	-,111	,022	-,200	,244
			p-valor	,421	,655	,655	,929	,421	,325
	Oi	10	C.C.	,244	-,156	<b>,511*</b>	,156	<b>,556*</b>	-,090
			p-valor	,325	,531	<b>,040</b>	,531	<b>,025</b>	,719
150	Ci	10	C.C.	,022	<b>,600*</b>	,378	-,067	-,156	<b>-,539*</b>
			p-valor	,929	<b>,016</b>	,128	,788	,531	<b>,031</b>
	Mi	10	C.C.	,022	-,111	,270	,200	,022	,067
			p-valor	,929	,655	,281	,421	,929	,788
	Oi	9	C.C.	-,222	<b>-,667*</b>	,167	-,071	-,500	,357
			p-valor	,404	<b>,012</b>	,532	,805	,083	,216

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 26. Correlación entre la expresión SOD1 y SOD2 en glándula mamaria de animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n	C.C.	p-valor
100	ci	10	,111	,655
	mi	10	,244	,325
	oi	10	,022	,929
150	ci	10	-,111	,655
	mi	10	,511*	,040
	oi	9	-,167	,532

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas; \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 27. Correlación entre la expresión de GPX1 y GPX4 en glándula mamaria en animales adultos previmante inducidos.**

Edad	Grupo	n	C.C.	p-valor
100	Ci	10	,854**	,001
	mi	10	,689**	,006
	oi	10	,689**	,006
150	Ci	10	,022	,929
	mi	10	,378	,128
	oi	9	-,143	,621

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas. \*\*: p<0.01 (en rojo); \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 28. Correlación entre los parámetros de GSH en plasma en animales adultos previamente inducidos.

Edad	Grupo	n		GSH		GSSG		GSH/ GSSG	
				C.C.	p-valor	C.C.	p-valor	C.C.	p-valor
100	Ci	10	GSH	---	---	,511*	,040	-,022	,929
			GSSG	,511*	,040	---	---	-,511*	,040
			GSH total	,778**	,002	,733**	,003	-,244	,325
	Mi	10	GSH	---	---	,090	,719	,467	,060
			GSSG	,090	,719	---	---	-,449	,072
			GSH total	,600*	,016	,494*	,048	,067	,788
	Oi	10	GSH	---	---	,156	,531	,244	,325
			GSSG	,156	,531	---	---	-,600*	,016
			GSH total	,778**	,002	,378	,128	,022	,929
150	Ci	10	GSH	---	---	,200	,421	,705**	,005
			GSSG	,200	,421	---	---	-,114	,652
			GSH total	,867**	,000	,333	,180	,568*	,024
	Mi	10	GSH	---	---	,222	,404	,535*	,046
			GSSG	,222	,404	---	---	-,254	,345
			GSH total	,833**	,002	,389	,144	,366	,173
	Oi	9	GSH	---	---	,197	,463	,648*	,016
			GSSG	,197	,463	---	---	-,167	,532
			GSH total	,535*	,046	,667*	,012	,167	,532

n: número de efectivos; C.C.: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas. \*\*: p<0.01 (en rojo); \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 29. Correlación entre la actividad hepática de GPX y los niveles plasmáticos de GSH y GSSG en animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n		GSH	GSSG	
100	Ci	10	GPX Act.	C.C.	,067	,022
				P-valor	,788	,929
	Mi	10	GPX Act.	C.C.	-,111	-,315
				P-valor	,655	,209
	Oi	10	GPX Act.	C.C.	-,022	,556*
				P-valor	,929	,025
150	Ci	10	GPX Act.	C.C.	-,090	-,180
				P-valor	,719	,472
	Mi	10	GPX Act.	C.C.	,167	-,389
				P-valor	,532	,144
	Oi	9	GPX Act.	C.C.	,366	,167
				P-valor	,173	,532

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas. \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

**Anexo Tabla 30. Correlación entre los niveles de MDA y 8-OHdG en animales adultos previamente inducidos.**

Edad	Grupo	n		
150	Ci	n (MDA) = 5; n (8-OHdG) = 10	C.C.	,111
			p-valor	1,000
	Mi	n (MDA) = 5; n (8-OHdG) = 10	C.C.	,400
			p-valor	,327
	Oi	n (MDA) = 5; n (8-OHdG) = 10	C.C.	,400
			p-valor	,327

n: número de efectivos; C.C: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas. Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

Anexo Tabla 31. Correlación entre los niveles de expresión de PARP y OGG y los niveles de 8-OHdG en animales adultos previamente inducidos.

Edad	Grupo	n		PARP mRNA	8-OHdG			
150	Ci	10	OGG mRNA	C.C.	,210	<b>- ,722**</b>		
				p-valor	,412	<b>,005</b>		
			PARP mRNA	C.C.	---	-,378		
				p-valor	---	,128		
			Mi	10	OGG mRNA	C.C.	,341	,205
						p-valor	,176	,417
	PARP mRNA	C.C.			---	,022		
		p-valor			---	,929		
	Oi	9			OGG mRNA	C.C.	,471	-,149
						p-valor	,087	,591
			PARP mRNA	C.C.	---	-,197		
				p-valor	---	,463		

n: número de efectivos; C.C.: Coeficiente de correlación Tau-b de Kendall. p-valor: nivel de significación para dos colas. \*\*: p<0.01 (en rojo); \*: p<0.05 (en azul). Ci: grupo de dieta control inducido; Mi: grupo de aceite de maíz inducido; Oi: grupo de aceite de oliva inducido.

